

Untersuchungen zur Toxizität und zum
Blutdruckverhalten trypanocider
Diamidine unter besonderer
Berücksichtigung von Pentamidin,
102/198 (Diamidinophenylindol) und
192/188 (Diimidazolinophenylindol)

von
Udo Steinmann
aus Nürnberg

Guss. Erlangen
1964

1001-105



Untersuchungen zur Toxizität und zum
Blutdruckverhalten trypanocider
Diamidine unter besonderer
Berücksichtigung von Pentamidin,
102/198 (Diamidinophenylindol) und
192/188 (Diimidazolinophenylindol)

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Udo Steinmann
aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den
Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 14.2.1984

Vorsitzender der

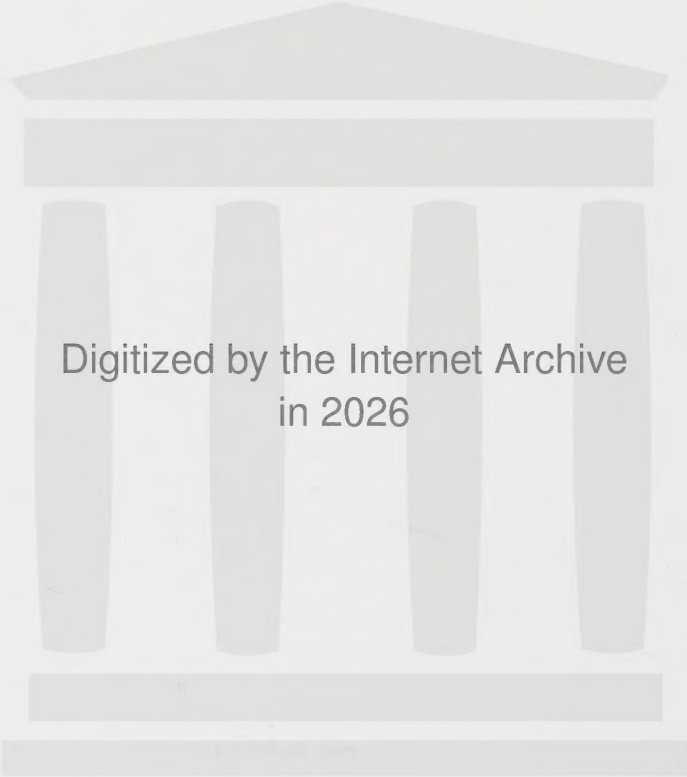
Promotionskommission : Prof. Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte r : Prof. Dr. C.-J. Estler

Zweitberichterstatte r : Prof. Dr. O. Dann

Für Gabriele

Meinen Eltern in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zusammenfassung	1
A) THEORETISCHER TEIL	4
1. Ausgangspunkt und Zielsetzung	4
1.1 Schlafkrankheit (Trypanosomiasis)- Erkrankung	4
1.2 Entwicklung trypanocider Verbindungen vom Diamidin-Typ	4
1.3 Biologische Wirkung von Diamidinen ..	10
1.3.1 Wirkung auf Mikroorganismen	10
1.3.2 Wirkung auf Viren	11
1.3.3 Bindung an DNA	11
1.3.4 Wirkung auf Tumoren	12
1.3.5 Verwendung in der Cytologie und Histo- logie	12
1.3.6 Wirkung auf Proteinstrukturen	13
1.3.6.1 Wirkung von Diamidinen auf andere En- zymsysteme im Proteinstoffwechsel ...	14
1.3.7 Wirkung von Diamidinen auf Enzymsy- steme der Zellatmung und Glycolyse ..	14
1.3.8 Hemmeigenschaften auf den Transmit- terstoffwechsel	15
1.3.9 Sonstige Wirkungen trypanocider Di- amide	15
1.4 Nebenwirkungen und Toxizität trypa- nocider Verbindungen in der Therapie	16
1.4.1 Toxizität	16
1.4.1.1 Akute Toxizität	16
1.4.1.2 Retardierte Toxizität	17

1.4.2	Nebenwirkungen von trypanociden Diamidinen auf den Glucosestoffwechsel	18
1.4.3	Verteilungsmuster trypanocider Verbindungen	18
1.5	Ziel der eigenen Untersuchungen	19
2.	Eigene Untersuchungen	23
2.1	Messung der akuten Toxizität	23
2.1.1	i.v. LD ₅₀ -Bestimmung an der Maus ...	23
2.1.1.1	Methode	24
2.1.1.2	Ergebnisse	24
2.2	Nachweis von 102/198 und 192/188 durch Fluoreszenz im Knochen	25
2.3	Untersuchungen zum Blutdruckverhalten verschiedener Amidine	28
2.3.1	Blutdruckverhalten der Versuchstiere ohne Behandlung	30
2.3.1.1	Blutdruckuntersuchung an wachen Ratten	30
2.3.1.2	Einfluß des Narkosemittels auf Blutdruck und Herzfrequenz	30
2.3.2	Screening des Blutdruckverhaltens an narkotisierten Ratten bei Behandlung mit trypanociden Diamidinen und gleichzeitiger Gabe potentieller Antagonisten	31
2.3.2.1	Screeningversuche mit 6-Imidazolinol-2-(4-imidazolinophenyl)indol 192/188, DIPI, 4',5-Bis(2-imidazolinyl)-1-benzofuran-2-carboxanilid (253/156) und 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-indol 102/198, DAPI	33
2.3.2.1.1	Allgemeine Angaben	33
2.3.2.1.2	Ergebnisse	33
2.3.2.1.2.1	Ohne Vorbehandlung	33
2.3.2.1.2.2	Noradrenalin	37

	Seite
2.3.2.1.2.3 Antihistaminika	38
2.3.2.1.2.4 Na-Cromoglycat, DSCG	39
2.3.2.1.2.5 Vasopressin, ADH	40
2.3.2.1.3 Zusammenfassung der Screeninger- gebnisse	41
2.3.3 Blutdruckuntersuchungen mittels invasiver (blutiger) Methode	42
2.3.3.1 Bestimmung des Hämatokritwertes bei Ratten	42
2.3.3.2 Blutige Druckmessung ohne Vorbe- handlung	43
2.3.3.2.1 Ergebnisse der Blutdruckuntersu- chungen von Pentamidin, 102/198, 192/188 und anderen Amidino- und Imidazolino-Verbindungen	43
2.3.3.2.1.1 Arterieller Mitteldruck ($\bar{p}$), sy- stolischer Druck (s) und diastoli- scher Druck (d)	53
2.3.3.2.1.2 Herzleistung, Flußminutenvolumen in der A. carotis (cf)	54
2.3.3.2.1.3 Herzfrequenz (f)	54
2.3.3.2.1.4 Venendruck (vp)	54
2.3.3.3 Blutige Druckmessung mit Vorbe- handlung	55
2.3.3.3.1 102/198 und 192/188 vorbehandelt mit Oxymetazolin	56
2.3.3.3.1.1 Zusammenfassung der Oxymetazolin- Versuche	60
2.3.3.3.2 Histaminreaktiver Effekt bei Pent- amidin-Antagonismus mittels Me- pyramin und Cimetidin	61
2.3.3.3.2.1 Histaminantagonismus - Kontrolle .	61
2.3.3.3.2.2 Pentamidin, Vorbehandlung mit Me- pyramin und Cimetidin	65
2.3.3.3.2.3 Pentamidin und Di-Natriumcromo- glycat, DSCG	68

	Seite
2.3.3.3.2.4	Leukotrien-Antagonist FPL 55712 71
2.3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der blutigen Druckmessung 74
2.4	Untersuchungen zur Gefäßwirkung verschiedener trypanocider Diamidine an der isolierten Aorta des Meerschweinchens in vitro 75
2.4.1	Versuchsablauf 76
2.4.2	Ergebnisse 76
2.4.2.1	pA ₂ -Werte 81
2.5	Diskussion der aus den Blutdruckuntersuchungen und den Versuchen an der isolierten Aortenspirale gewonnenen Ergebnisse 83
2.6	Weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Diamidine 85
2.6.1	Histologische Befunde 85
2.6.1.1	Nachweis von 102/198 und 192/188 durch Voigt-Färbung in der Leber, Niere, Gefäßwand und im Herzen 85
2.6.2	EKG-Untersuchungen an der Ratte 88
2.6.2.1	Allgemeine Angaben zum Ratten-EKG .. 88
2.6.2.2	Methode 88
2.6.2.3	Ergebnisse 89
2.6.2.4	Zusammenfassung 95
2.6.3	Interaktionen mit anionischen Strukturen 97
2.6.3.1	Fällungsreaktion bis-kationischer Diamidine mit energiereichen Phosphaten 97
2.6.3.1.1	Methode 97
2.6.3.1.2	Ergebnisse..... 98
2.6.3.2	Fluoreszenzverhalten 101
2.6.3.2.1	Methode 101
2.6.3.2.2	Ergebnisse 101
2.6.4	Orientierender Versuch zum Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien unter Diamidineinwirkung 106

	Seite
2.6.4.1	Mitochondrien: Aufbau und Funktion . 106
2.6.4.2	Atmungskontrolle der Elektronen- transportrate 108
2.6.4.3	Entkoppler und Hemmer der oxydativen Phosphorylierung 110
2.6.4.4	Mitochondrien 111
2.6.4.5	Substrat 113
2.6.4.6	Messung des Sauerstoffverbrauches von Rattenleber-Mitochondrien 113
2.6.4.7	Ergebnisse 114
2.6.4.8	Zusammenfassung und Diskussion des orientierenden Versuches zur Mito- chondrienatmung 115
2.6.5	Untersuchungen zur Hemmwirkung von Diamidinen auf Enzymsysteme 121
2.6.5.1	Energiesystem kontraktiler Elemente 121
2.6.5.2	Messungen zur CK-Hemmung 122
2.6.5.3	Messungen zur Hemmung des gekoppel- ten Enzymsystems HK/Glu-6-P-DH 122
2.6.5.4	Erstellen einer realen Hemmkurve für CK und HK/Glu-6-P-DH 123
2.6.5.5	Ermittlung der ID_{50} für das gewählte Testsystem 124
2.6.5.6	Feststellung des Hemmtyps 124
2.6.5.7	Ergebnisse der Hemmwirkungen 124
2.7	Messung klinisch-chemischer Blutwer- te bei der Maus nach Behandlung mit trypanociden Diamidinen 130
2.7.1	Serumenzyme 130
2.7.1.1	Vorkommen, Pathologie 130
2.7.1.2	GOT / S-GOT 131
2.7.2	Veränderungen des S-GOT-Gehaltes nach Gabe von trypanociden Diamidi- nen 132
2.7.2.1	Methode 132
2.7.2.2	Ergebnisse 132

	Seite
2.7.3	Serumlipide 137
2.7.3.1	Serumtriglyceride 137
2.7.3.2	Ergebnisse 137
2.7.4	Serumglucose 138
2.7.4.1	Veränderungen des Serumglucosespie-
	gels nach Diamidinbehandlung 138
2.7.4.1.1	Methode 138
2.7.4.1.2	Ergebnisse 139
2.8	Diskussion 143
B)	EXPERIMENTELLER TEIL 154
3.	Allgemeine Angaben 154
3.1	Versuchstiere 154
3.1.1	Mäuse 154
3.1.2	Ratten 154
3.1.3	Meerschweinchen 154
3.2	Chemikalien, Lösungsmittel 155
3.3	Verwendete Hilfsmittel 155
4.	Versuchsbeschreibungen 157
4.1	Gewinnung von Serum 157
4.2	Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-
	Transaminase, GOT 157
4.3	Bestimmung des Serumglucosegehaltes 159
4.4	Bestimmung des Blutdrucks an der wa-
	chen Ratte 161
4.5	Versuchsaufbau beim Blutdruckscreen-
	ing und der Messung der Beeinflus-
	sung des Blutdrucks durch das Narko-
	semittel 163
4.6	Hämatokrit-Bestimmung des Rattenblu-
	tes 164
4.7	Versuchsaufbau zur blutigen Druck-
	messung, Bestimmung des Venendrucks
	und der Flußrate 164

4.7.1	Blutige Messung des arteriellen Drucks und Bestimmung der Herzfrequenz	164
4.7.2	Blutige Messung des venösen Drucks	166
4.7.3	Bestimmung der Flußrate durch induktive Messung	166
4.8	Versuchsaufbau zur Messung der Hemmung noradrenalin-induzierter Kontraktionen an der Meerschweinchen-aortenspirale	168
4.8.1	Präparation der Aortenspirale	168
4.8.2	Registrierung der Kontraktionen ...	169
4.8.3	Nährlösung	169
4.8.4	Versuchsablauf	171
4.9	Versuchsaufbau zur Messung der Mitochondrien-Atmung mit Rattenleber-mitochondrien	172
4.9.1	Präparation der Rattenleber und Isolierung der Mitochondrien nach Schneider	172
4.9.1.1	Zusammensetzung des Präparations-mediums (PM)	172
4.9.1.2	Gewinnung der Rattenleber	172
4.9.1.3	Mitochondrien-Isolierung	172
4.9.2	Messung der Atmungsaktivität	173
4.9.2.1	Lösungen	173
4.9.2.2	Versuchsaufbau	174
4.9.2.3	Eichung	177
4.9.2.4	Durchführung der Messung	177
4.9.2.5	Berechnung	178
4.10	Versuchsaufbau zur Messung der Hemmeigenschaft der Diamidine gegenüber CK-HK/Glu-6-P-DH	180
4.10.1	Aktivitätsbestimmung der CK	180
4.10.2	Aktivitätsbestimmung der HK/Glu-6-P-DH	182

	Seite
4.10.3	Auswertung 183
4.11	Histologische Untersuchungen 184
4.11.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 184
4.11.2	Lichtmikroskopie 184
4.12	Färbereagenz nach Voigt 184
4.13	Statistik 185
4.13.1	Mittelwerte 185
4.13.2	Standardabweichung 185
4.13.3	Standardabweichung des Mittelwertes (S.E.M., Standard Error of the Mean) 185
4.13.4	Berechnung der Signifikanzen 186
4.13.4.1	t-Test 186
4.13.4.2	Einfache Varianzanalyse 187
4.13.5	Berechnung einer Regressionsgeraden nach Schild 187
C)	ANHANG 190
A.I	Untersuchungen am Auge 190
A.1	Untersuchungen zur Wirksamkeit von Diimidazolino-Verbindungen als Mio- tika 191
A.1.1	Vorversuch 191
A.1.2	Messungen des Augeninnendruckes 193
A.1.2.1	Versuchstiere 193
A.1.2.2	Methode 193
A.1.2.3	Herstellung der Lösungen 195
A.1.3	Ergebnisse 196
A.II	Tabellen /Graphiken 198
D)	LITERATURVERZEICHNIS 218
	Lebenslauf 236

Zusammenfassung

Mittels verschiedener Methoden wurde versucht, die nach Verabreichung verschiedener trypanocider, biskationischer Verbindungen auftretenden toxischen Nebeneffekte, insbesondere diejenigen am Herzkreislaufsystem, aufzuklären. Als Standardsubstanzen wurden 1,5-Bis-(4-amidino-phenoxy)pentan (Pentamidin), 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol (DAPI, Code-Nr. 102/198) und 6-Imidazolino-2-(4-imidazolino-phenyl)-indol (DIPI, Code-Nr. 192/188) verwendet.

Histologisch konnte mit einer speziellen Färbetechnik die Lokalisation der biskationischen Substanzen im Lichtmikroskop ohne Fluoreszenzeinrichtung in Leber, Herz und Niere ohne eine Strukturbindung, im Gefäßschnitt mit bevorzugter Bindung im Bereich sarkoplasmatischer Strukturen, sichtbar gemacht werden.

Die Verbindungen führten an narkotisierten Ratten zu einer dosisabhängigen Verminderung des Blutdruckes und der Herzleistung. Die Herzfrequenz veränderte sich je nach Substanztyp verschieden. Neben Tachycardien, vor allem bei den Amidinoverbindungen, konnten auch Bradycardien beobachtet werden. Durch Vorbehandlung mit verschiedenen Antagonisten konnten zwei Angriffspunkte für die Blutdrucksenkung wahrscheinlich gemacht werden: eine Senkung des peripheren Widerstandes infolge Vasodilatation und eine Verminderung der

Herzleistung. Bezüglich der vasalen Wirkung konnte sowohl eine Blockierung von α -Adrenozeptoren für alle untersuchten Substanzen als auch eine direkte oder indirekte Stimulierung von Histaminrezeptoren für Pentamidin festgestellt werden.

Der vasale Angriffspunkt (α -Antagonismus) wurde am isolierten Gefäßstreifen (Meerschweinenaorta) überprüft und bestätigt. Die höchste Affinität zu den α -Adrenozeptoren hatten 102/198 sowie Pentamidin mit pA_2 -Werten von 6,0 bzw. 6,12.

Für eine cardiodepressive Wirkung sprach eine Verminderung der Carotisdurchblutung (nach allen Substanzen). Im EKG fand sich insbesondere bei höherer Dosierung der Diamidine das Bild einer akuten Herzhypoxie. Auf molekularer Ebene ergaben sich Interaktionen der Diamidine mit energiereichen Phosphaten (ATP) und energieliefernden Enzymsystemen (Creatinkinase). ATP bildet Assoziationsprodukte mit den biskationischen Verbindungen, was sich in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität und einer Verschiebung der Anregungswellenlängenmaxima zu längeren Wellenlängen und der Emissionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen hin bemerkbar machte. Untersuchungen mit isolierten Rattenlebermitochondrien zeigten, daß die Substanzen 102/198, 192/188 und Petamidin im Bereich von 0,1 bis 0,45 mmol nach dreiminütiger

Inkubation als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung wirkten. Mit letzteren Ergebnissen könnten die toxischen Auswirkungen dieser Verbindungsklassen auf das Herz erklärt werden.

Diese Befunde sprechen aber auch dafür, daß die Wirkung der Diamidine nicht organspezifisch ist. Dieser Vermutung entsprach ein Anstieg der GOT im Serum nach Gabe von 10 bzw. 30 mg/kg KG 102/198, 192/188 und Pentamidin i. p. Der Anstieg dieses zellspezifischen Enzyms im Serum spricht für eine Zellschädigung der Leber oder anderer Organe.

Klinisch-chemische Untersuchungen ergaben weiterhin eine Zunahme des Serum-Glucosegehaltes. Bei einmaliger i. p.-Verabreichung von 10 mg/kg der Verbindungen 102/198, 192/188 und Pentamidin fanden sich kaum signifikante Veränderungen; 30 mg/kg einmalig i. p. verabreicht führten nach zwei Stunden (102/198, Pentamidin) bzw. schon nach einer Stunde (192/188) zu hyperglykämischen Werten, die nachfolgend in leichte Hypoglykämien übergingen. Nach 72 Stunden waren die Normalwerte wieder erreicht. Die Ursache der hyperglykämischen Wirkung ist nicht bekannt. Es könnte sich um die Folge einer gesteigerten Glykogenolyse oder einer verminderten Glukoseutilisation (Insulinmangel) handeln. Als Ursache für die Hypoglykämie kommt ein gesteigerter Glukoseverbrauch infolge Störung des oxydativen Stoffwechsels in Frage.

A) THEORETISCHER TEIL

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung

1.1 Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) - Erkrankung

Als Schlafkrankheit werden allgemein Formen der afrikanischen Trypanosomiasis des Menschen bezeichnet (158). Als Überträger fungieren bei der afrikanischen Trypanosomiasis verschiedene Glossina-Arten.

Diese klimatisch bedingten Zoonosen stellen für den Menschen wegen ihrer Übertragbarkeit eine ständige Gefährdung dar. Auch Tiere, und in hohem Maße die für die Ernährung wichtigen Rinder, werden von den Parasiten befallen (Tab. 1.1). Hier haben sich zum Teil ausgeprägte Wirtsansprüche herausgebildet. Teilweise dienen Tiere aber auch als Infektionsreservoir menschenpathogener Trypanosomen (51,63,195).

1.2 Entwicklung trypanocider Verbindungen vom Diamidin-Typ

Ausgangspunkt für die Entwicklung dieser Substanzklasse war die Beobachtung, daß Trypanosomen für ihre Pathogenität offensichtlich auf Glucose im umgebenden Medium angewiesen sind (44,85,165,176,248).

V. Jancsó / v. Jancsó (119) und die Gruppe Schern / Artagaveytia - Allende (199) griffen diese Beobachtung auf und setzten das von Frank (77) und Mitarb. 1926 eingeführte, blutzuckersenkende Guanidin-Derivat SYNTHALIN (Abb. 1.2) zur Behandlung infizierter Mäuse ein.

Entgegen der Meinung von v. Jancsó / v. Jancsó, die kurative Wirkung der Verbindung bei der Trypanosomiasis beruhe auf der Blutzuckerreduktion, konnten Schern/Artagaveytia-Allende keine kurative Wirkung mit anderen blut-

glucosesenkenden Wirkstoffen feststellen, was auf einen direkten Einfluß von Synthalin auf Trypanosomen schließen ließ. L o u r i e und Y o r k e (141) konnten dies mit ihren Ergebnissen stützen, die zeigten, daß Synthalin bereits in niedrigeren Dosen als für die Blutzuckerspiegelsenkung notwendig, trypanocid wirksam war.

K i n g , L o u r i e und Y o r k e (129) untersuchten 1938 aliphatische Biguanide mit verschiedenen Kettenlängen auf ihre trypanocide Aktivität, wobei sich das 1,11-Diamidinoundecan als am stärksten wirksam erwies (Abb. 1.2).

Eine weitere Wirkungssteigerung konnte durch die Variation der aliphatischen Kette zu lipophilen aromatischen Zwischengliedern erreicht werden. Hier brachten vor allem das bei MAY & BAKER Ltd. entwickelte STILBAMIDIN, PROPAMIDIN und PENTAMIDIN (7) (Abb. 1.2) eine deutliche Verbesserung. Letzteres hatte gegenüber dem lichtempfindlichen, chemisch instabilen Stilbamidin (79,81,110) deutliche Vorteile. Um die bei Stilbamidin mit einer Erhöhung der Toxizität einhergehende Instabilität (9,81,110) im Licht, eine trans-cis-Umlagerung sowie Dimerisierung des Moleküls, zu umgehen, schlug H e n r y (110) vor, die wirksame, weniger toxische trans-Form mittels Ringschluß zu stabilisieren. Dieser Weg wurde jedoch wegen des inzwischen auf dem Markt befindlichen, stabileren Pentamidin verlassen, welches eine gute Wirksamkeit gegen *T. gambiense* und eine mäßig gute gegen *T. rhodesiense* zeigte.

Wegen der schlechten Aktivität des Pentamidin gegen das rinderpathogene *T. congolense* wurde von J e n s c h (121) bei den Farbwerken HOECHST 1955 eine neue Verbindung vorgestellt, DIMINACEN (Berenil[®]) (Abb. 1.2), welche auch gute Aktivitäten gegen *T. congolense*, *T. vivax* und Babesien aufwies.

Erreger	Krankheit	Wirt
Trypanosoma brucei gambiense	afrikanische Schlafkrankheit	Mensch, Ratte Haustiere (Schwein)
T. brucei rhodesiense	ostafrikanische Schlafkrankheit	Mensch
T. brucei brucei	Nagana	Pferd, Esel Hund, Katze Nagetiere
T. evansi	Surra	Pferd, Kamel Elefant
T. vivax	Nagana	Rind, Schaf
T. congolense	Nagana	Rind

Tab. 1.1 (nach Dönges)

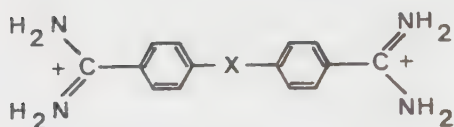
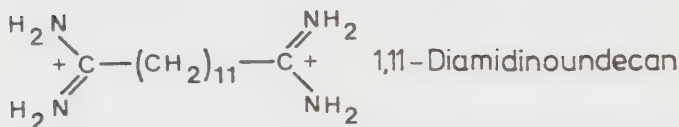
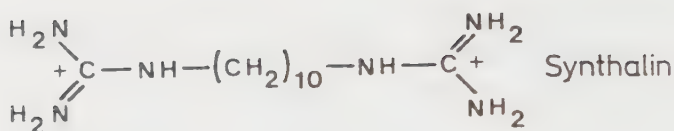
Dieses wegen seiner Instabilität gut verträgliche Diamidin wurde von Fußgänger (84), Raether (170,171,172), Gilbert (95) und Bailey (8) eingehend untersucht und seine geringe Toxizität, die mit einer geringen Nebenwirkungsrate einhergeht, bestätigt, was die Substanz auch für den Menschen verwendbar macht (8,84,95). Eine gegen *T. congolense* höchst wirksame Verbindung mit kurativen und gleichzeitigen prophylaktischen Eigenschaften wurde geschaffen, als MAY & BAKER das von der Fa. BOOTS vorgestellte ETHIDIUM (235) (Abb. 1.2) mit einer Hälfte von DIMINACEN zum ISOMET-AMIDIUM (Samorin[®]) (Abb. 1.2) verknüpfte (12,13,14).

Zunehmende Resistenzprobleme und das Fehlen einer Wirkung auf die meningo-encephalitische Phase der humanen Trypanosomiasis führten dazu, daß Dann und Mitarb. 1970 auf der Suche nach länger wirksamen, prophylaktisch nutzbaren trypanociden Verbindungen das Konzept von Henry wieder aufgriffen und einen neuen Typ biskationischer trypanocider Amidino-Verbindungen vorstellten. Dabei stand vor allem eine eventuelle Anwendung dieser Substanzen im Spätstadium der Erkrankung zur Diskussion, d. h. ein Überwinden der Blut-Liquor-Schranke.

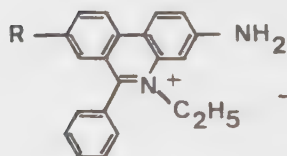
Bereits die erste Verbindung 98/202 (Abb. 1.3) von Hieke (49) zeigte eine sehr gute Wirksamkeit gegen menschenpathogene *T. gambiense*, aber auch *T. rhodesiense* (173) und *T. brucei* (120).

98/202 scheint aber nicht ins ZNS einzudringen (120). Dennoch konnten Erfolge im Spätstadium der Erkrankung von Ogada (160) und Raether (173) beschrieben werden.

Hinsichtlich der Analogie zum Pentamidin und Diminacen wurden weiterhin die Verbindungen 150/49 (Abb. 1.3)

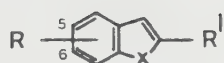


X	
$-\text{O} - (\text{CH}_2)_3 - \text{O} -$	Propamidin
$-\text{O} - (\text{CH}_2)_5 - \text{O} -$	Pentamidin (Lomidine ^R)
$-\text{N} = \text{N} - \text{NH} -$	Diminacen (Berenil ^R)
$-\text{CH} = \text{CH} -$	Stilbamidin



R	
$\text{H}_2\text{N} -$	Ethidium
$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 - \text{N} = \text{N} - \text{HN} - \\ \\ \text{H}_2\text{N}^+=\text{C} \backslash \\ \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Isometamidium (Samorin ^R)

Abb. 1.2



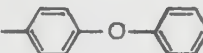
R	R ^I	X	Ref.
Am (5) —	 Am	O	150/49 ⁽⁵²⁾
Am (6) —	 Am	S	98/202 ⁽⁴⁹⁾
Am (6) —	 Am	NH	186/134 ⁽⁵⁴⁾

Abb. 1.3

und 102/198 (52) (Abb. 2.1), mit guten trypanociden Eigenschaften gegen *T. rhodesiense*, *T. gambiense* (150/49) und *T. congolense* (102/198), entwickelt.

1.3 Biologische Wirkung von Diamidinen

1.3.1 Wirkung auf Mikroorganismen

Neben ihrer trypanociden Wirkung weisen viele Diamidine wachstumshemmende Aktivitäten gegen andere Mikroorganismen auf.

So werden für STILBAMIDIN und PENTAMIDIN gute bakteriocide Wirkungen (4,20) angegeben. Dies konnte auch für verschiedene Substanzen von Dann et al. nachgewiesen werden (4).

Hier zeigten sich gute Hemmeigenschaften für 102/198 (Abb. 2.1) und 186/134 (Abb. 1.3) (4,54).

DIMINACEN (Abb. 1.2) zeigt eine gute Wirksamkeit gegen Brucellen (84).

Wegen seiner kurativen Aktivität bei Infektionen mit *Pneumocystis carinii* wird PENTAMIDIN zur Behandlung dieser gefährlichen interstitiellen Pneumonie eingesetzt (60,178,230).

Neben Trypanosomen und Bakterien wurden noch eine Vielzahl anderer sensibler Mikroorganismen beschrieben, wie Babesien (Stilbamidin, Pentamidin, Diminacen) (76,84,112), Leishmanien (Stilbamidin, Pentamidin) (112,134,217) und Plasmodien (Stilbamidin, Pentamidin, Diminacen, 102/198) (108,112,134,217,218).

Über fungistatische Eigenschaften wird von Berenil® (84), STILBAMIDIN (4,112), PENTAMIDIN (4,60), 102/198 (4), der ringgeschlossenen Imidazolinyl-Verbindung 192 / 188 (DIPI) (229) (Abb. 2.2) und anderen aus dem Dann'schen Arbeitskreis entstandenen Diamidinen berichtet (4,50).

1.3.2 Wirkung auf Viren

Bereits sehr frühzeitig wurde die *v i r u s t a t i -*
s c h e Wirkung bestimmter Amidine beobachtet (45).
Als Substrat lagen Influenza- und Mumpsvirus vor, auf
die PENTAMIDIN und STILBAMIDIN eine gute Hemmwirkung
entfalteten (67). Hier schließen sich Befunde von
M i l d n e r (153) und d e C l e r g (57) an,
die für eine Reihe von trypanociden Diamidinen eine
Hemmung onkoviraler DNA-Polymerase feststellen konn-
ten.

1.3.3 Bindung an DNA

Den ersten Hinweis für das Eingreifen trypanocider
Diamidine in den Nukleoproteidstoffwechsel lieferten
Niederschläge und eine vermutliche Bindung an Ribo-
nukleinsäuren und Nukleoproteide, bei der Behandlung
mit STILBAMIDIN und PENTAMIDIN (19,21,193).

Angeregt durch die Erkenntnisse von M a c a d a m
und W i l l i a m s o n J. (144,145,146), die Ver-
änderungen der Kinetoplasten-DNA feststellten, konnten
W i l l i a m s o n D. H. und F e n n e l l (241)
1975 für das Erlanger 102/198 eine Bindung an A-T-rei-
che DNA-Strukturen nachweisen. Dieser Bindungstyp war
vorher auch vom DIMINACEN bekannt geworden (33,159).

Als Bindungstyp der Diamidine wurden Interkalationen
(42,129) und Außenanlagerung (26,72,73,220,221) be-
schrieben. Die Tatsache einer reinen Außenanlagerung
wird weiterhin gestützt durch Ergebnisse von L i n
(139) und K o l b (132).

Die Kenntnisse von den Wechselwirkungen zwischen DNA
und trypanociden Diamidinen führte in der Folge zu einer
breiteren Erforschung der DNA-Wechselwirkungen selbst,
sowie den daran gekoppelten Proteinsynthesestrukturen
und letztlich zu Untersuchungen von Proteinsystemen
selbst (s. 1.3.6).

1.3.4 Wirkung auf Tumoren

Einen frühen Beweis für die Hemmwirkung, die Guanidine auf das Wachstum neoplastischer Zellen ausüben, erbrachten Untersuchungen des oxidativen Stoffwechsels an normalen und Tumorgeweben durch D i c k e n s (61) 1936. S n a p p e r (193) führte STILBAMIDIN in die Therapie multipler Myelome ein.

Im Arbeitskreis um O. D a n n wurde mit der Verbindung 1 5 0 / 1 2 9 (Abb. 2.1) eine gut gegen den Leukämie-Standardtumor L 1210 wirksame Substanz geschaffen (55). Diese Verbindung zeigte auch mäßig gute Ergebnisse gegen T. brucei rhodesiense.

1.3.5 Verwendung in der Cytologie und Histologie

Die selektive Bindung von 102/198 an A-T-reiche DNA-Abschnitte führte zur Verwendung der Substanz bei verschiedenen Problemstellungen in der Cytologie.

H a j d u k (103) färbte damit Kinetoplasten-DNA in T. equiperdum an.

W i l l i a m s o n und F e n n e l l (241) benutzten DAPI zur Unterscheidung von Kern- und mitochondrialer Hefe-DNA, R u s s e l l (184) konnte damit Mycoplasmen in Zellkulturen nachweisen, G r o ß g e b a u e r (99) verwendete DAPI zu Routineuntersuchungen verschiedener Untersuchungsmaterialien, S c h w e i z e r (214,215) konnte damit pflanzliche Metaphase-Chromosomen, L i n (91) Mäusezellkerne und S c h n e d l (204,205, 206) Humanchromosomen untersuchen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Diamidine auch zur Lösung histologischer Probleme eingesetzt.

H ö k f e l t (115) setzte 150/129 (Abb. 2.1) zum Nachweis des retrograden Transports in Neuronen ein und E d e n (68) 102/198 zur Differenzierung verschiedener Neuronen.

1.3.6 Wirkung auf Proteinstrukturen

G e r a t z (88) konnte 1969 gute Hemmeigenschaften von PENTAMIDIN und DIMINACEN, die mit einem Amidiniumrest substituiert sind, gegenüber den für Lysin- und Arginin-spezifischen S e r i n p r o t e a s e n feststellen (1).

Es zeigten sich hohe Affinitäten gegenüber Trypsin (89), Thrombin (87), Plasmin und Plasminogenaktivator (86,90), sowie gegenüber Kallikrein (91). Ähnliche Hemmeigenschaften entfalten aber auch M o n o - amidino-substituierte Verbindungen, wie WALSMANN berichtete (233).

T i d w e l l (223,224) prüfte eine große Anzahl der von D a n n und Mitarb. hergestellten trypanociden Diamidine und Diimidazoline auf ihre Hemmeigenschaften gegenüber den o. a. Proteinasen. Hierbei zeigten nur die Amidino-Verbindungen gute Hemmeigenschaften, bei ringgeschlossenen "Amidinen" vom Diimidazoliny-Typ ging die Hemmwirkung im allgemeinen verloren, was auf die besondere Struktur des Trypsins und seiner Verwandten zurückzuführen ist.

A c h e r (1) beschrieb für die proteolytischen Enzyme Chymotrypsin, Trypsin und Elastase eine substratspezifische Tasche im Enzym, in welche die Seitenketten verschiedener Aminosäuren hineinragen, ein Bindungsmechanismus, der für die Diamidine auch beschrieben ist (211). Dieser Bindungstyp ist bei den ringgeschlossenen Diimidazolininen sterisch behindert.

Auf Grund der Hemmung eiweißspaltender Enzyme ergeben sich für die Diamidine zahlreiche Interaktionsmöglichkeiten im physiologischen Bereich, wie z. B. Hemmung des Komplement-Faktors C_1 (107), Hemmung des Blutgerinnungssystems (90) und Auswirkungen auf das Kreislaufsystem (91).

1.3.6.1 Wirkung von Diamidinen auf andere Enzymsysteme im Proteinstoffwechsel

Die Angriffspunkte trypanocider Diamidine in biologischen Regelkreisen der Zellen scheinen mannigfaltig zu sein. So berichten M a r s h a l l (152) von verminderter Proteinsynthese aus Pyruvat durch eine Hemmung der PYRUVAT-DECARBOXYLASE, A m o s / V o l l m a y e r (3) und H i c k s (111) von gehemmten TRANSAMINIERUNGS-Reaktionen, B e r n h e i m (17,18) und B l a s c h k o (27,29) über Hemmungen von MONOAMINOXIDASEN, Z e l l e r (249) und B l a s c h k o (28,29) über Hemmungen von DIAMINOXIDASEN, B i c h o w s k y - S l o m n i t z k i und G o r d o n (97) von einer Hemmung der LEUCINOXIDASE und ALANINDESAMINASE, W i e n (238), A m o s / V o l l m a y e r (3) von vermindertem GLUTAMAT-STOFFWECHSEL.

1.3.7 Wirkung von Diamidinen auf Enzymsysteme der Zellatmung und Glycolyse

Neben der Vielzahl von Interaktionen im Proteinstoffwechsel zeigen die trypanociden Diamidine und die chemisch verwandten Biguanide Hemmeigenschaften gegen zahlreiche Enzymsysteme des Glucosestoffwechsels und der oxidativen Phosphorylierung.

So berichteten S t e i n e r (219) und W i e n (238) von einer Hemmung der CYTOCHROMOXIDASE (=Cytochrom-c-(red)-Sauerstoff-Oxidoreductase) und der SUCCINOXIDASE (= Succinat-CoQ-Oxidoreductase), J u d a h / W i l l i a m s - A s h m a n (122) von einer Hemmung der OXIDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG, S e v a g / G o t s (190) und W i e n (238) von einer Hemmung der GLUCOSEOXIDATION, M a r s h a l l (152) von einer Hemmung der DIPHOSPHOGLYCERIN-ALDEHYD-DEHYDROGENASE, W i e n (238) von der MALATOXIDASE, B e r n h e i m (17), W i e n (238) und B i c h o w s k y - S l o m n i t z k i (22)

von der PYRUVATOXIDASE. D i c k e n s (61) stellte für verschiedene guanidino-substituierte Verbindungen eine Hemmung des Pasteur-Effektes fest.

1.3.8 Hemmeigenschaften auf den Transmitterstoffwechsel

Die Hemmung der Cholinesterase durch STILBAMIDIN war schon lange bekannt (15).

H a r b a u m - N e u h a u s (105) und S c h ü r - g e r (209) haben für eine Reihe der Erlanger Verbindungen starke Hemmeffekte auf die Acetylcholinesterase feststellen können. Dabei zeigten sich die Diimidazoliny-Verbindungen vom Typ des 192/188 durchwegs als bessere Hemmstoffe (210) als die Diamidino-Verbindungen.

1.3.9 Sonstige Wirkungen trypanocider Diamidine

Durch ihre chemische Struktur bedingt, zwei im physiologischen pH-Bereich immer dissoziiert vorliegende kationische Flanken, ist für die Diamidine die Möglichkeit gegeben, mit anionischen Verbindungen zu interagieren, wie HEPARIN, HYALURONSÄURE, POLYPHOSPHATE, NEURAMINSÄURE u. ä.

W a l l i s (232) zeigte die Verdrängung von MAGNESIUM und POLYAMINEN an Ribosomen. Für PENTAMIDIN konnten B o r n s t e i n (31) und J a f f e (118) die Hemmung der Synthese von PHOSPHOLIPIDEN beschreiben. Neuerdings wurden auch Leberlysosomen als Bindungsstellen für Diamidine erkannt (2,146,236).

W e i s s m a n n (236) und H i r s c h h o r n (114) konnten für STILBAMIDIN cortisonähnliche Wirkungen auf Lysosomenmembranen feststellen.

1.4 Nebenwirkungen und Toxizität trypanocider Verbindungen bei der Therapie

1.4.1 Toxizität

1.4.1.1 Akute Toxizität

Zahlreiche Autoren beschrieben bisher eine kreislaufdepressorische Wirkung der trypanociden Diamidine (91, 142, 193).

W i e n (239) konnte bei Untersuchungen an Katzen für STILBAMIDIN, PENTAMIDIN und PROPAMIDIN (Abb. 1.2), nach Injektion von 1 mg Substanz i. a., Reduktionen des arteriellen Blutdrucks bis 50% feststellen.

F u ß g ä n g e r (84) beschreibt für DIMINACEN, bei Injektionen von 0,6 - 2,2 mg/kg i. v., Blutdrucksenkungen bis 80 mm Hg für Hunde und bis 40 mm Hg für Katzen.

Zur Erklärung dieses Effekts gibt W i e n (239) eine e r g o t o x i n - ä h n l i c h e Wirkung an.

Andere Autoren machen eine H i s t a m i n l i b e r a t i o n dafür verantwortlich (96), was für PROPAMIDIN, STILBAMIDIN (69, 148) und PENTAMIDIN (177) belegt ist. Diese Blutdrucksenkung geht meist mit einem Anstieg der Herzfrequenz (74, 84, 142, 160, 239) einher.

Als weiteres Zeichen einer akuten Intoxikation wurden E r b r e c h e n , T r e m o r , A t e m n o t , A t e m l ä h m u n g , K r ä m p f e , A t a x i e n nach Verabreichen von DIMINACEN [MTD¹⁾ beim Hund: 20 mg/kg KG i. m., (84)], ISOMETAMIDIUM [2,5 mg/kg KG i. v. bei der Ratte (162)] und PENTAMIDIN [100 mg/kg KG i. p. bei der Maus (142, 239)] angegeben.

1) MTD = maximal tolerierte Dosis

1.4.1.2 Retardierte Toxizität

O a s t l e r und Mitarb. (202) stellten bei Hunden, die mit STILBAMIDIN (0,8 - 2 mg/kg täglich) 4-21 Tage lang behandelt wurde, Zeichen von ZNS-Störungen fest. Diese Beobachtung wurde p. m. mittels Autopsie bestätigt. Es zeigten sich hämorrhagische Nekrosen im Hirnstamm und Entzündungen der Hirnhäute.

S c h m i d t und Mitarb. (202,203) konnte dies auch für hohe Dosen (40 mg/kg) der von D a n n und Mitarb. synthetisierten Diamidine 98/202 und 102/198 (Abb. 1.3 und 2.1) nachweisen.

Nach STILBAMIDIN-Applikation kam es zu Trigemiusparalysen (187).

S c o t t (189) macht dafür eine besondere Sensibilität des V. Hirnnerven verantwortlich.

R u e b u s h (180) beschreibt eine Polyneuritis nach Gabe von 50 mg DIMINACEN am ersten und jeweils 2 mg/kg täglich am zweiten und dritten Tag einer Behandlung einer Babesien-Infektion.

Über n e p h r o t o x i s c h e Erscheinungen von PENTAMIDIN während der Behandlung einer Pneumocystis carinii Pneumonie mit 4 mg/kg Pentamidin täglich, berichten d e V i t a (60) und E m m e r (70). Nach 10-12 Tagen wurden erhöhte Blut-Harnstoff-N-Werte und Creatinin-Ausscheidungsstörungen festgestellt. Bei der Autopsie zeigten sich Nekrosen der Nierentubuli. Über Nierenparenchymschäden konnte auch S c h m i d t (203) berichten.

Die relativ schlechte Gewebsverträglichkeit trypanocider Diamidine dokumentieren Befunde anderer Autoren bei der s. c. Applikation.

Hier bildeten sich Nekrosen an den Einstichstellen, oft in Form von sterilen Abszessen (76,227).

S a u n d e r s (188) berichtete von mehreren Patienten, die nach verschiedenen i. m. applizierten Dosen von PENTAMIDIN über Jucken oder Brennen an den Einstichstellen klagten.

W a n g (234) beschrieb eine toxische epidermale Nekrolyse nach Behandlung einer Pneumocystis carinii Pneumonie mit PENTAMIDIN (4 mg/kg tägl., 4 Wochen lang). Ferner trat eine Azotämie auf.

1.4.2 Nebenwirkungen von trypanociden Diamidinen auf den Glucosestoffwechsel

Die Auswirkungen verschiedener Diamidine auf den Glucosestoffwechsel scheinen, von der Entwicklung der Substanzen her (Synthalin) gesehen, widersprüchlich.

So wird von Hypoglykämien nach PENTAMIDIN-Injektion berichtet (40,98,130,240), aber auch über Hyperglykämien, vor allem bei Applikation höherer Dosen (163,240). Es kam auch zur Ausbildung eines Diabetes Mellitus unter einer PENTAMIDIN-Therapie (32,37,157, 163).

Auch von DIMINACEN wurden Steigerungen des Blutglucose-spiegels nach 7 mg/kg i. m. beschrieben (10).

1.4.3 Verteilungsmuster trypanocider Verbindungen

Möglicherweise sind diese toxischen Erscheinungen eine Folge der S e l e k t i v i t ä t, mit der sich die trypanociden Diamidine in einzelnen Geweben anreichern.

So reichert sich ISOMETAMIDIUM bei Ratten in den Hepatocyten, den Speicheldrüsendrüsen, in den Nierentubuli, in den Pankreasinseln, in den Lymphknoten, im Thymus und in der Milz besonders stark an (162).

STILBAMIDIN und PENTAMIDIN wurden in vergleichsweise hoher Konzentration in Niere, Leber und Lunge gefunden (80,135,175,231).

B u s c h (38) und K a l i w o d a (126) konnten bei pharmakokinetischen Untersuchungen mit 102/198, 98/202, 150/49 und 261/115 (Abb. 1.3 und 2.1) höchste Konzentrationen in Leber, Niere und Speicheldrüsen feststellen.

1.5 Ziel der eigenen Untersuchungen

In der vorgelegten Studie wurde zunächst die akute Toxizität verschiedener trypanocider Diamidine untersucht.

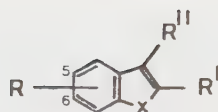
Als Parameter hierfür sollte zunächst die LD₅₀ bestimmt werden.

Da bei der Verwendung verschiedener Substanzen dieser Gruppe in vivo als unerwünschte Reaktion immer eine Blutdrucksenkung auftrat, was den therapeutischen Einsatz zum Teil in Frage stellte, sollte weiterhin in einer systematischen Untersuchung der Einfluß verschiedener Diamidine auf die Herz-Kreislauf-funktion von Versuchstieren (Ratten) vergleichend und systemisch geprüft werden.

Dazu waren nach einer Eingrenzung der möglichen Angriffspunkte der Substanzen mittels unblutiger (indirekter) Druck- und Frequenzmessungen in einem Screeningverfahren, eine genaue Analyse des Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Herzleistung mittels blutiger (invasiver) Meßmethoden notwendig.

Durch Einsatz von Hilfssubstanzen mit möglicherweise protektiver oder antagonistischer Wirkung sollte versucht werden, den Wirkungsmechanismus aufzuklären. Die so gewonnenen Ergebnisse waren anhand isolierter Organsysteme zu präzisieren und die eventuelle Interaktion mit bestimmten Strukturen, im Sinne einer Rezeptorbindung, zu beweisen.

Da sich in der Literatur verschiedene Hinweise auf eine Leberschädigung durch Diamidine finden lassen,



R	R ^I	R ^{II}	X	Ref
Am (6) —		— H	NH	102/198 ⁽⁵²⁾
Am (5) —		— NH ₂	O	301/27 ⁽³⁴⁾
Am (6) —	— Am	— H	NH	261/115 ⁽¹⁸¹⁾
Am (6) —	— Am	— NH ₂	NH	313/40 ⁽¹⁸³⁾
Am (6) —		— H	NH	313/35 ⁽¹⁸³⁾
Br (6) —	— Am	— H	NH	314/44 ⁽¹⁵⁰⁾
		— H	NH	313/24 ⁽¹⁸³⁾
				150/129 ⁽⁵⁵⁾

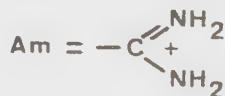
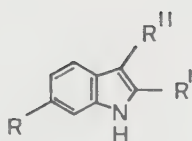
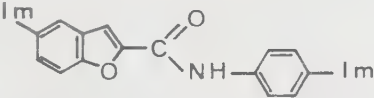
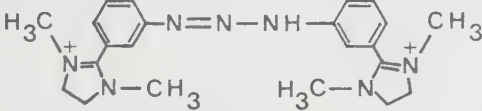


Abb. 2.1



R	R'	R''	Ref
Im —	 Im	—H	192/188 ⁽²²⁹⁾
Im —	 Im	—NH ₂	297/150 ⁽⁷⁸⁾
Im —	— Im	—H	261/116 ⁽¹⁸¹⁾
			(53) 253/156
			43387 (HOECHST)

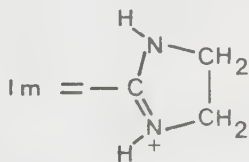


Abb. 2.2

sollten zusätzlich bestimmte leberspezifische Blutparameter als Indikatoren für eine derartige Schädigung nach Diamidin-Gabe enzymatisch bestimmt werden.

Ebenso waren mögliche Veränderungen des Blutglucosespiegels, ein Effekt, der für andere Verbindungen dieses Typs bekannt ist, nach Applikation der zu untersuchenden Substanzen zu überprüfen.

Abschließend sollte auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse eine eventuelle Parallelität mit der akuten Toxizität der Diamidine dargestellt werden.

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Messung der akuten Toxizität

2.1.1 i.v. LD₅₀-Bestimmung an der Maus

Zur Ermittlung der in der Literatur fehlenden Daten über die akute Toxizität der verwendeten Diamidine bei intravenöser Gabe wurde zu Beginn der Untersuchungen eine Bestimmung der LD₅₀ vorgenommen. Eine Übersicht über literaturbekannte Werte verschiedener Diamidine gibt Tab. 2.3.

Substanz	LD ₅₀ i.p. mg/kg	LD ₅₀ i.v. mg/kg	LD ₅₀ s.c mg/kg
STILBAMIDIN		31 (239)	180 (239)
PROPAMIDIN		42 (239)	55 (239)
PENTAMIDIN (Lomidine®)		28 (239)	64 (239)
DIMINACEN (Berenil®)			258 (84)
102/198 DAPI	66 (126)	37,3 (218)	
98/202	117 (126)		

Tab. 2.3 Toxizität verschiedener trypanocider Diamidine bei der Maus;
in Klammern Literaturstellen

2.1.1.1 Methode

Männlichen NMRI-Mäusen von 20-25 g KG wurden steigende Dosen von Pentamidin (Abb. 1.2), 102/198 (Abb. 2.1) oder 192/188 (Abb. 2.2) über eine Schwanzvene injiziert. Dies geschah langsam, in höheren Dosen im Zeitraum bis zu 5 Minuten. Das Injektionsvolumen betrug einheitlich 0,01 ml/g KG. Tab. Anhang A 2.1 zeigt die applizierten Dosen, berechnet auf Bausegehalt, die Anzahl der Versuchstiere, die Anzahl der gestorbenen Tiere und die nach *L i t c h f i e l d / W i l c o x o n* (14) mittels Regressionsgraden berechnete LD₅₀.

Die Beobachtungsdauer betrug 14 Tage.

Für 192/188 wurde zusätzlich noch eine LD₅₀-Bestimmung unter gleichen Bedingungen für die i.p.-Applikation durchgeführt.

2.1.1.2 Ergebnisse

In Tab. 2.4 sind die Ergebnisse aus beiden Versuchsserien zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß der für Pentamidin und 102/198 gefundene Wert gut mit Literaturwerten (218,239) übereinstimmt.

Pentamidin erwies sich etwa um den Faktor 1,5 toxischer als 102/198 bzw. 192/188.

	LD ₅₀ mg/kg KG	Regress.-Gerade	Regress.- Koeff. (r ²)
PENTAMIDIN	27,1 i.v.	y = 3,3x - 38,6	0,87
102/198	41,7 i.v.	y = 2,5x - 54,2	0,99
192/188	42,7 i.v.	y = 2,5x - 56,7	0,97
192/188	79,6 i.p.	y = 1,1x - 36,8	0,93

2.2 Nachweis von 102/198 und 192/188 durch Fluoreszenz im Knochen

Wie bereits erwähnt, wurde STILBAMIDIN von S n a p p e r (193) bei Myelomen eingesetzt. Dies ließ eine gewisse Affinität dieser Substanzklasse zu bestimmten Strukturen des Knochens bzw. des Knochenmarks vermuten.

Eine Einlagerung in Knochengewebe würde die sehr lange Aufenthaltsdauer von 102/198 im Körper erklären helfen, die in der dritten Phase ca. 60 Tage beträgt (38).

Zur Überprüfung einer eventuellen Interaktion von 102/198 und 192/188 mit Knochengewebe wurden NMRI-Mäusen einmalig jeweils 50 mg/kg KG der Substanz i.v. verabreicht.

Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet und jeweils ein Oberschenkelknochen entnommen, Paraffin-Dünnschnitte gefertigt und unter UV-Licht ausgewertet.

In beiden Fällen konnte gegenüber einer Kontrolle eine deutliche Fluoreszenz festgestellt werden (Abb. 2.5 und 2.6), so daß angenommen werden muß, daß beide Substanzen zu Knochengewebe eine Affinität zeigen.

Dies erscheint schon deshalb möglich, da B u s c h (38) bei Untersuchungen mit [^{14}C] 102/198 hohe Aktivitäten in der Fraktion der "Restratte" fand. Diese Organfraktion bestand im wesentlichen aus dem Stützapparat (Knochengerüst, Muskulatur) und der Haut.

Wie in Abb. 2.6 zu sehen, sind Ablagerungen der Stoffe in der Subst. spongiosa zu finden, wogegen das Knorpelgewebe fluoreszenzfrei ist. Auch in der S. compacta war die Fluoreszenz nachweisbar. Da aus den Schnitten nicht eindeutig feststellbar war, an welche Zellen im Bereich der Spongiosa des Knochens die Bindung erfolgte, könnte es sein, daß die Diamidine nicht nur an anionische Phosphatgruppen des Knochens sondern auch an Zellkerne des blutbildenden Apparates binden.



Abb. 2.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des
distalen Mausfemur (Vergr. 400 x)
Kontrolle, unbehandelt

- 1 = Knorpelzone mit Chondrozyten
- 2 = Übergangszone zum spongiösen Knochen
- 3 = S. spongiosa



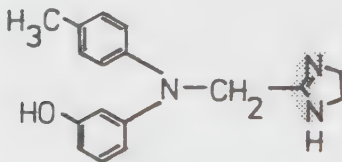
Abb. 2.6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des
distalen Anteils eines Mausfemur
(Vergr. 400 x)

Ablagerung von 102/198 (helle Fluoreszenz)
im Bereich der S. spongiosa

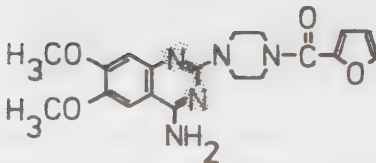
- 1 = Knorpelzone mit Chondrozyten
- 2 = Übergangszone zum spongiösen Knochen
- 3 = S. spongiosa

2.3 Untersuchungen zum Blutdruckverhalten verschiedener Amidine

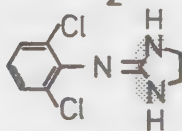
Eine Beeinflussung der Blutdruckregulation durch Amidin- bzw. Imidazolin-Strukturen ist seit langem bekannt. Für die trypanociden Diamidine konnte dies **W i e n** (239), wie bereits erwähnt, nachweisen. Doch auch Mono-Amidine und Imidazoline wirken auf die Blutdruckregulation ein. So sind in den therapeutisch genutzten α -Sympatholytika **PHENTOLAMIN** und **PRAZOSIN** (Abb. 2.7) durchaus larvierte Amidinstrukturen vorhanden. Auch das viel verwendete **CLONIDIN** und das weniger verwendete **GUANETHIDIN** (Abb. 2.7), die beide bei schweren Hypertonien eingesetzt wurden oder werden, enthalten prinzipiell eine Amidin-, das Guanethidin darüberhinaus auch eine dem Synthalin vergleichbare Guanidin-Struktur.



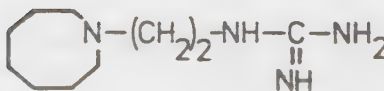
Phentolamin
(Regitin^R)



Prazosin
(Minipress^R)



Clonidin
(Catapresan^R)



Guanethidin
(Ismelin^R)

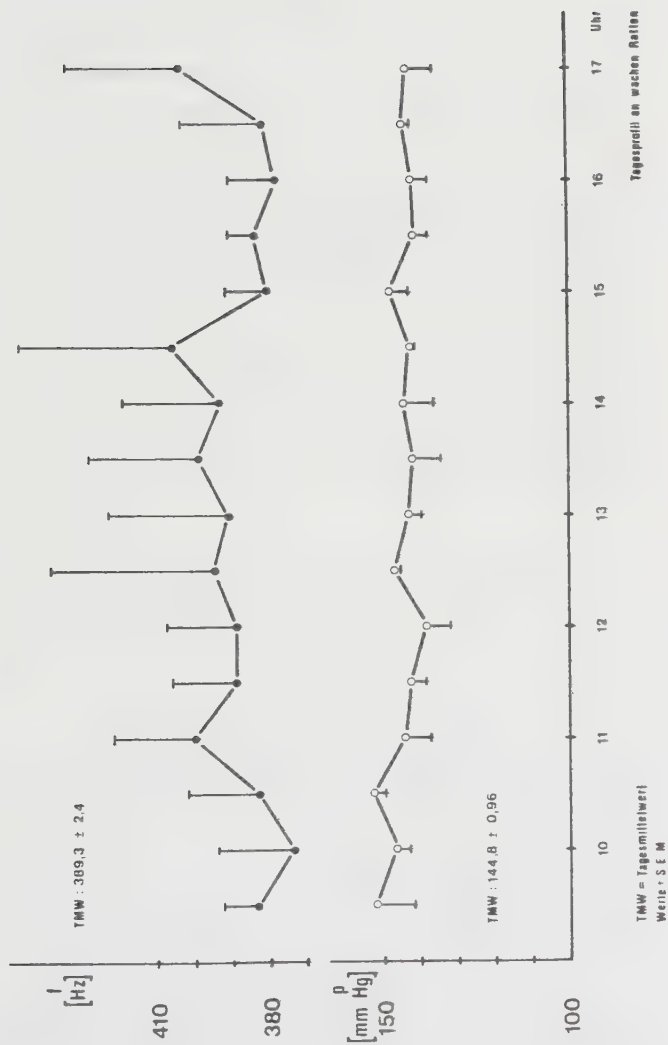


Abb. 2.8 Blutdruck-(p) und Herzfrequenz-(f) tagesprofil wacher Ratten

2.3.1 Blutdruckverhalten der Versuchstiere ohne Behandlung

2.3.1.1 Blutdruckuntersuchung an wachen Ratten

Um den Blutdruckeffekt der zu untersuchenden Amidine eindeutiger interpretieren zu können, d. h. um Tagesschwankungen und spontan-hypertensive Tiere auszuschalten und um Narkosemitteleinflüsse erkennen zu können, wurde vor Beginn der eigentlichen Untersuchung ein Blutdruckprofil an wachen Tieren in der Zeit aufgenommen, in der die Messungen normalerweise durchgeführt werden sollten (Versuchsaufbau und Methode siehe Kap. 4.4). In Abb. 2.8 sind die Ergebnisse dieses Versuches aufgezeigt. Jeder Punkt entspricht einem Durchschnittswert von 3-5 Messungen pro Tier/ pro Zeitpunkt/ pro 5 Tiere.

Aus diesen Messungen ergab sich ein Tagesmittelwert von

144,8 $\pm$ 3,84 [mm Hg] für den Blutdruck und
389,3 $\pm$ 9,6 [Hz] für die Herzfrequenz, (Werte
 $\pm$ SD),

ohne eine ausgeprägte circadiane Rhythmik.

2.3.1.2 Einfluß des Narkosemittels auf Blutdruck und Herzfrequenz

Der Einfluß von Narkosemitteln auf das Kreislaufgeschehen ist bekannt (96).

Nach Abschluß der Messung im Wachzustand wurde zur Überprüfung der Narkosemittelwirkung den bereits verwendeten Versuchstieren 1,3 g/kg Urethan i. p. (168) verabreicht und nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 und 60 Minuten unblutig (s. Kap. 4.5) Blutdruck und Herzfrequenz gemessen.

Hierbei ergaben sich 5 Minuten p. i. beim Blutdruck die stärksten Abweichungen vom Tagesmittelwert mit - 50 mm Hg, während die Herzfrequenz im Laufe einer Stunde um ca. 20 Hz zurückging. Die Druckverhältnisse stabilisierten sich zwar im Laufe des Untersuchungszeitraumes, lagen aber nach 30-45 Minuten noch 30 mm Hg unter dem Tagesmittel (Abb. 2.9).

2.3.2 Screening des Blutdruckverhaltens an narkotisierten Ratten bei Behandlung mit trypanociden Diamidinen und gleichzeitiger Gabe potentieller Antagonisten

Über den genauen Mechanismus der Beeinflussung des Blutdrucks nach Applikation von diamidino-, monoamidino- und guanidino-substituierten Verbindungen herrscht nach wie vor Unklarheit (71,91,239).

Möglicherweise treten jedoch Interaktionen mit Bindungsstellen für Neurotransmitter des vegetativen Nervensystems auf (239).

Eine erste Übersicht über mögliche Angriffspunkte der Substanzen konnte durch ein Screeningverfahren an narkotisierten Ratten erhalten werden.

Mittels u n b l u t i g e r D r u c k m e s s u n g, d. h. ohne operativen Eingriff, sollte nach i n t r a - v e n ö s e r Applikation (Versuchsaufbau s. Kap. 4.5) und entsprechender Vorbehandlung mit Antagonisten solcher Substanzen, die physiologisch eine Blutdrucksenkung auslösen (Histamin, Blocker der vegetativen Neurotransmitterwirkung am Gefäß), eine Eingrenzung der Angriffspunkte für die Blutdrucksenkung erreicht werden.

Da von Pentamidin und biskationischen Amidinium-Verbindungen, im Vergleich zu den verwandten Diimidazolin-Verbindungen, zur Thematik der Blutdrucksenkung einige Literaturdaten vorhanden sind, wurden für diese Tests bevorzugt Diimidazolin-Verbindungen ausgewählt.

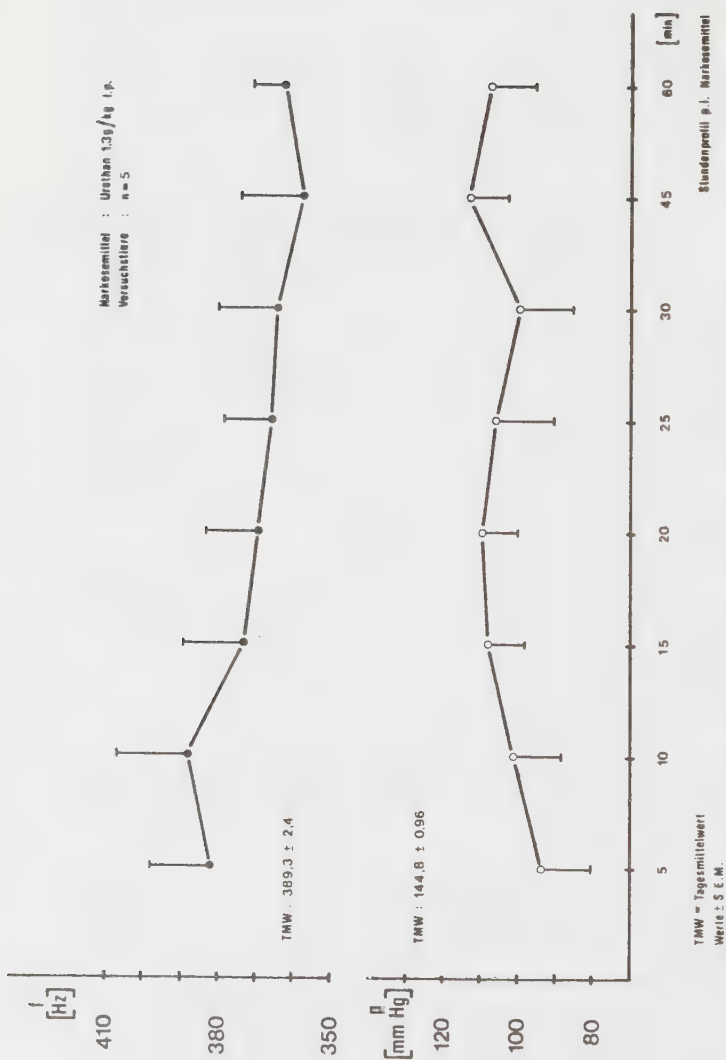


Abb. 2.9 Einfluß des Narkosemittels auf Blutdruck (p) und Herzfrequenz (f) der Ratte.

Deutliche Reduktion der Werte gegenüber Tagesmittelwert (TMW) bis 60 Minuten p. i.

2.3.2.1 Screeningversuche mit 6-Imidazolino-2-(4-imidazolinophenyl)indol 192/188, DIPI, 4',5-Bis(2-imidazolinyl)-1-benzofuran-2-carboxanilid (253/156) und 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol 102/198, DAPI

2.3.2.1.1 Allgemeine Angaben

Für die in 2.3.2 genannten Versuche und o. a. Substanzen wurden pro Meßwert jeweils 3-5 männliche Wistar-Ratten von 200-350 g Gewicht verwendet. Wegen der in 2.3.1.2 beschriebenen kreislaufdepressiven Wirkung des Narkosemittels wurden die Tiere frühestens 30 Minuten nach Narkosebeginn in den Versuch genommen. Die Injektion der Substanzlösung erfolgte über einen Verweil-Katheter in eine Schwanzvene.

Die Dosis betrug für alle Substanzen 2 mg/kg KG, berechnet auf Basengehalt.

Die Blutdruck- und Frequenzwerte wurden nach folgenden Zeiten registriert: vor dem Versuch (= Ausgangswert), 0 (= unmittelbar nach Injektion), 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten nach Injektion.

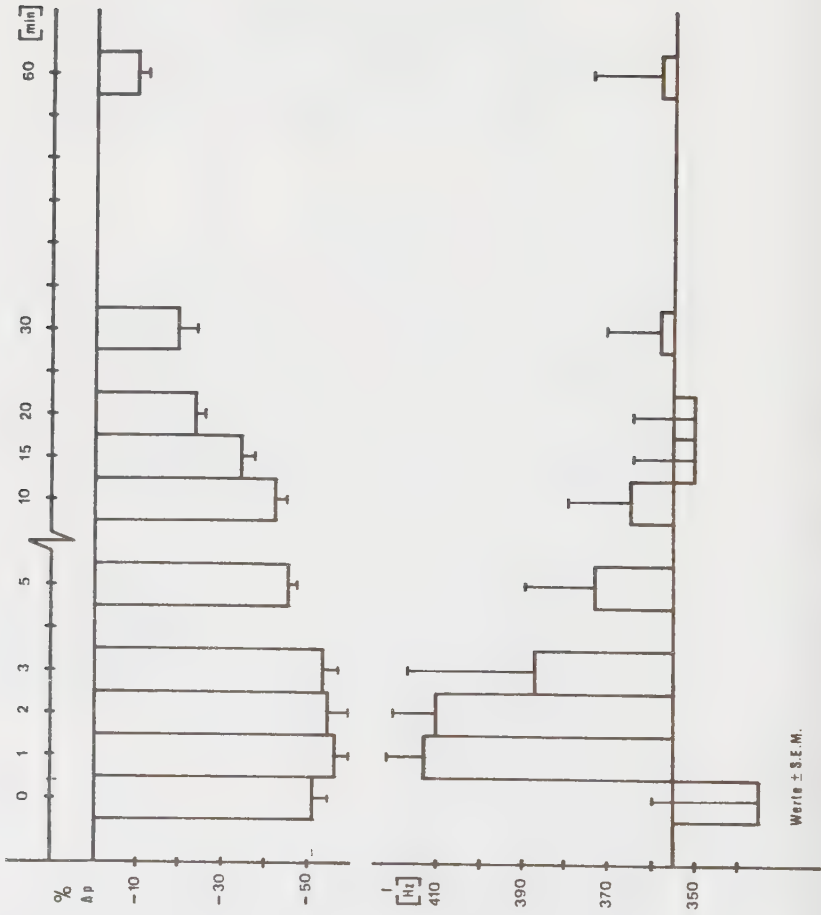
2.3.2.1.2 Ergebnisse

2.3.2.1.2.1 Ohne Vorbehandlung

Die drei Substanzen unterschieden sich in ihrem Wirkprofil etwas untereinander.

102/198 und 192/188 waren, bei annähernd gleichem Molekulargewicht, in ihrer Potenz, den Blutdruck zu senken, in Zeit und Ausmaß etwa gleich. Beide führten innerhalb von 1-2 Minuten zu Druckverlusten um 55%, bezogen auf den Ausgangsdruck vor Applikation. Nach 30 Minuten lagen die Druckwerte noch immer 15-20% unter dem Ausgangswert.

Abb. 2.10 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diamidines



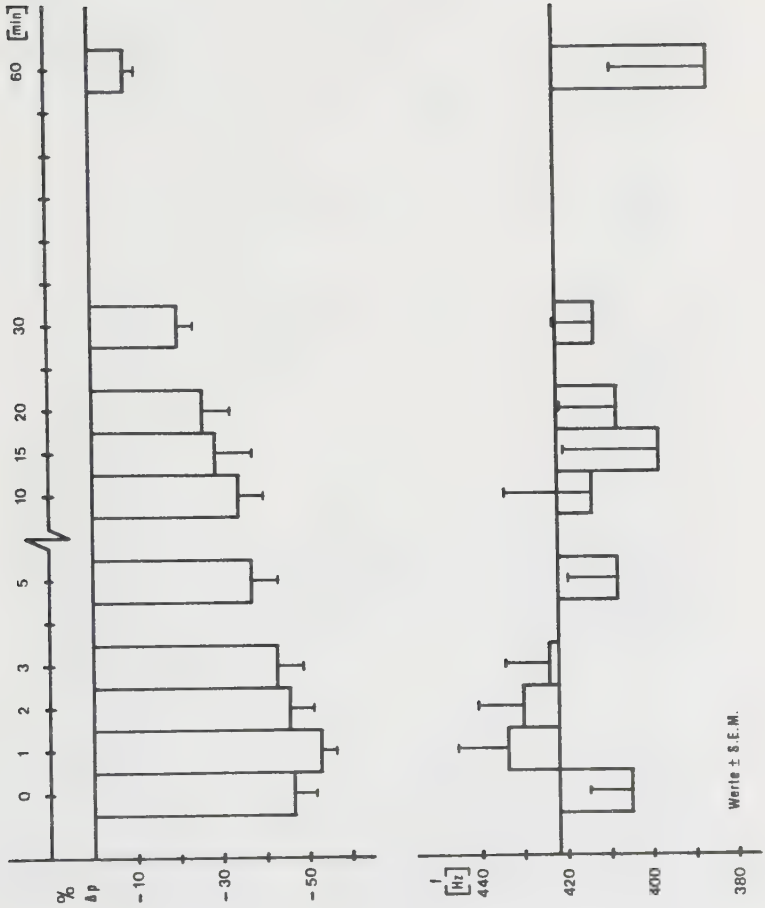


Abb. 2.11 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diimidazo-
lines

192/188
2 mg/kg i.v.

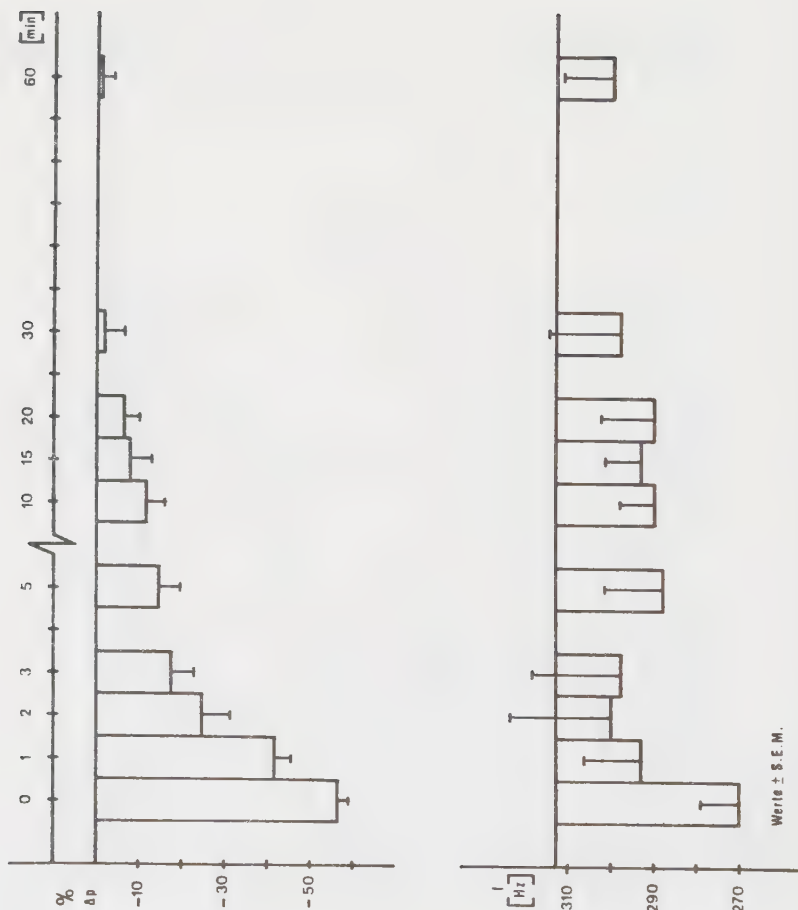


Abb. 2.12 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Dilmidazo-
lines

253/156
2 mg/kg i.v.

Werte $\pm$ S.E.M.

60 Minuten p. i. war noch eine Drucksenkung von ca. 10% nachweisbar (Abb. 2.10 und 2.11). 253/156 senkte den systolischen Druck unmittelbar p. i. in etwa der gleichen Größenordnung (55%), zeigte aber in der Zeitabhängigkeit des Effektes deutliche Unterschiede. Bereits nach 3-5 Minuten betrug der Druckverlust nur noch ca. 20%, nach 20-30 Minuten lag praktisch kein Unterschied mehr zum Ausgangswert vor (Abb. 2.12).

Sehr deutliche Unterschiede zeigten die registrierten Herzfrequenzen während des Versuches.

Nach Gabe von 102/198 kam es innerhalb von 1 Minute zu einer deutlichen Frequenzerhöhung, die nach 10-15 Minuten nicht mehr nachweisbar war.

Bei 192/188 war ein Frequenzanstieg nur in geringem Maße zu verzeichnen. Nach 5-10 Minuten lag die Frequenz geringfügig unter dem Ausgangswert.

253/156 führte in dieser Versuchsserie zu keinerlei Frequenzanstieg. Hier waren die Frequenzen über den gesamten Beobachtungszeitraum dem Ausgangswert gegenüber vermindert.

2.3.2.1.2.2 Noradrenalin

Wenn die durch Diamidine und Diimidazoline bewirkte Blutdrucksenkung vorwiegend in einer Wirkung auf die Gefäße ihre Hauptursache hat, so sollte dieser Effekt möglicherweise durch prophylaktische Gabe von Noradrenalin verhindert werden, da Noradrenalin über eine α -Rezeptorerregung eine Gefäßkonstriktion hervorruft. Wegen der relativ kurzen Wirkdauer von Noradrenalin bei intravenöser Injektion wurde die Substanz s. c. verabreicht, um einen prolongierten Effekt zu erreichen.

100 μ g/kg KG Noradrenalin (Na-bitartrat, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, berechnet auf Base)

wurde den Tieren unter die Nackenhaut s. c. 5 Minuten vor Diamidin-Applikation gespritzt. Im Laufe dieser 5 Minuten stieg der Blutdruck auf Grund der Noradrenalinwirkung am Gefäßsystem um ca. 5-10% an, wogegen die Herzfrequenz zu leicht niedrigeren Werten tendierte, was als normale Gegenregulation über das parasympathische System zu erwarten war.

Eine signifikante Hemmung des Blutdruckabfalls nach anschließender Diamidin-Gabe konnte aus den errechneten Mittelwerten des maximalen Druckverlustes bei keiner der drei Verbindungen festgestellt werden, wenngleich Tendenzen zur Reduktion des depressiven Effektes sichtbar wurden (Abb. Anhang A 2.2 bis A 2.4).

2.3.2.1.2.3 Antihistaminika

Wie bereits erwähnt, setzen Stilbamidin, Propamidin und Pentamidin Histamin frei (69,96,148,177).

Ob dies auch für die Diimidazoliny-Verbindungen 192/188 und 253/156 Gültigkeit besitzt, sollte eruiert werden.

An anderer Stelle wird noch gezeigt werden (Kap. 2.3.3.3.2), daß ein durch Histamin erzeugter Blutdruckabfall nur mit einer Kombination aus einem H_1 - und einem H_2 -Rezeptorenblocker antagonisiert werden kann, weshalb den Versuchstieren 10 mg/kg KG ($3,5 \times 10^{-5}$ M/kg KG) Mepyramin-Base¹⁾ als H_1 -Blocker 30 Minuten vor dem Versuch i. p. und 10 mg/kg KG (4×10^{-5} M/kg KG) Cimetidin als H_2 -Blocker 2 Minuten vor dem Versuch i. v. verabreicht wurden. Beide Dosierungen lagen etwas über der Konzentration, die für einen histamin-antagonistischen Effekt bei intravenöser Gabe notwendig ist (Kap. 2.3.3.3.2).

1) Fa. Pfleger, Bamberg, stellte dankenswerterweise für die Versuche Mepyraminmaleat kostenlos zur Verfügung.

Die Substanzen waren in physiologischer Kochsalzlösung (Mepyramin) oder in Aqua ex amp. (Cimetidin) gelöst.

Bezüglich der Blutdruckwerte und der Herzfrequenz konnte bei den mit Antihistaminika behandelten Tieren gegenüber den nicht vorbehandelten Versuchstieren keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abb. Anhang A 2.5 und A 2.6), so daß es unwahrscheinlich ist, daß die Blutdrucksenkung über eine Histaminfreisetzung zustande kommt. In die gleiche Richtung deuten die Versuche mit DSCG (Kap. 2.3.2.1.2.4).

2.3.2.1.2.4 Na-Cromoglycat, DSCG ¹⁾

Na-Cromoglycat gilt als Stabilisator von Mastzellen und hemmt ihre Degranulation (96), d. h. die Freisetzung von Histamin und anderen vasoaktiven Stoffen. Es greift aber wahrscheinlich auch in andere Mechanismen antigen induzierter Immunreaktionen ein (47). Die Vorbehandlung der Tiere mit DSCG sollte somit einen durch solche Stoffe verursachten Blutdruckabfall verhindern.

Um den Effekt einer Mastzelldegranulation durch Amidine abschätzen zu können, wurde 30 Minuten vor Behandlung mit 2 mg/kg KG 102/198, 100 mg/kg KG DSCG i. p. verabreicht.

Nach Cox et al. (47) reichen 5 mg/kg KG DSCG 15 Minuten vorher i. v. verabreicht aus, um eine bei Ratten durch ein Antigen verursachte anaphylaktische Reaktion zu 50% zu unterdrücken.

Unsere Versuche zeigten, daß sich der Blutdruckabfall und die Steigerung der Herzfrequenz bei den mit DSCG vorbehandelten Tieren nicht signifikant von den Werten unterschieden, die von nicht vorbehandelten Tieren ermittelt wurden (Abb. Anhang A 2.7).

¹⁾ DSCG wurde freundlicherweise von der Fa. Fisons Ltd., Loughborough, England, kostenlos zur Verfügung gestellt.

Wenn auch die Mastzellendegranulation nicht unmittelbar gemessen werden konnte, so hat es doch den Anschein, als ob aus Mastzellen stammende vasoaktive Stoffe nicht als Mediatoren der durch die Diamidine verursachten Blutdrucksenkung seien.

2.3.2.1.2.5 Vasopressin, ADH

Das Nonapeptid Vasopressin (Adiuretin) stellt physiologisch den Regulator für die Wasserrückresorption in den distalen Tubuli und Sammelrohren der Niere dar. In unphysiologisch hohen Dosen kontrahiert es die glatte Muskulatur der Gefäße und konnte deshalb als Antagonist für einen möglichen nicht-adrenozeptorgebundenen Angriff von 192/188 oder 253/156 am Gefäßsystem dienen.

2 E/kg ADH (Pitressin®) ¹⁾ wurden den Versuchstieren 5 Minuten vor der i. v. Injektion der Wirkstofflösung i. p. verabreicht.

Infolge der Gefäßwirkung von ADH stieg das Blutdruckniveau deutlich an, die Herzfrequenz ging gegenregulativ um 10-15% zurück.

Weder für 192/188 noch für 253/156 konnte mit ADH eine Verminderung des hypotensiven Effektes erreicht werden. Die prozentualen Veränderungen nach Gabe der beiden Substanzen blieben im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Versuchstieren, bei 50-60% Druckabfall gegenüber dem Kontrollwert gleich.

Die Herzfrequenzen entwickelten sich ähnlich wie bei den nicht vorbehandelten Kontrolltieren.

Eher kam es im Laufe der Versuche zu einer Verschlechterung des gesamten Kreislaufgeschehens mit länger anhaltender Hypotension.

¹⁾ Fa. Goedecke, Freiburg, sei für die kostenlose Überlassung der Ampullen herzlich gedankt.

2.3.2.1.3 Zusammenfassung der Screeningergebnisse

Für die untersuchten Substanzen 102/198, 192/188 und 253/156 können auf Grund der Ergebnisse der Blutdruckversuche folgende Aussagen gemacht werden:

1. Ein Zustandekommen der Blutdrucksenkung über eine Liberation von Histamin u. a. vasoaktiven Stoffen aus Mastzellen scheint unwahrscheinlich.
2. Eher ist es wahrscheinlich, daß die Substanzen mit dem adrenergen System interagieren.
3. Vasopressin konnte die Blutdrucksenkung nicht aufheben, was dafür spricht, daß die Interaktion der getesteten Substanzen mit dem adrenergen System nicht der einzige Mechanismus der Blutdrucksenkung ist. Hier muß in erster Linie an eine Beeinflussung des Herzens gedacht werden.

Im weiteren sollte nun mittels invasiver (blutiger) Druckmessung versucht werden, die aus den Screening-Versuchen gewonnenen Erkenntnisse eines vermutlichen Antagonismus zu Neurotransmittern des vegetativen Nervensystems eindeutiger zu belegen.

2.3.3 Blutdruckuntersuchungen mittels invasiver (blutiger) Methode

Die unblutige Blutdruckmessung, wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, bietet den Vorteil, daß durch geringen Aufwand relativ rasch eine orientierende Aussage getroffen werden kann. Nachteilig macht sich bemerkbar, daß keinerlei Aussagen über das Verhalten des d i a s t o l i s c h e n Druckes gemacht werden können, da das Gerät nur den systolischen Druckwert angibt. Ferner treten immer dann Schwierigkeiten auf, wenn der Druck sehr stark abfällt, da kleine Pulsationen der Arterien vom Piezoaufnehmer nicht mehr registriert werden und letztlich ist keine Aussage über das Niederdrucksystem (venöse Seite) möglich. Für weitere Untersuchungen wurde daher das Blutdruckverhalten mit der genaueren, blutigen Methode untersucht.

Da die alleinige Messung des peripheren Druckes keine Aussage über eine direkte Wirkung der untersuchten Substanzen auf das Herz zuläßt, wurde zum Zweck der Überprüfung der Herzleistung das Durchflußvolumen/Minute in der A. carotis simultan mitregistriert. Dies erfolgte ohne Gefäßöffnung auf induktive Weise (Kap. 4.7.3).

Voraussetzung für diese Form der Blutdruckmessung war, daß der Hämatokritwert der Versuchstiere bekannt war.

2.3.3.1 Bestimmung des Hämatokritwertes bei Ratten

Der Hämatokritwert wurde deshalb nach der laborüblichen Methode (Kap. 4.6) bestimmt.

In Analogie zum Humanhämatokrit zeigten sich auch hier leichte Differenzen zwischen weiblichen und männlichen Individuen.

♂ —	Ratten	45-50%
♀ —	Ratten	40-45%

2.3.3.2 Blutige Druckmessung ohne Vorbehandlung

Die blutige Druckmessung erfolgte wie in Kap. 4.7 beschrieben.

Es wurden neben den bereits angesprochenen Verbindungen (Pentamidin, 102/198, 192/188) eine ganze Reihe Substanzen aus dem Dann'schen Arbeitskreis untersucht (Abb. 2.1 und 2.2).

Den Tieren wurden jeweils 0,1, 1,0 oder 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$, berechnet auf Base, über einen Femoralis-Katheter verabreicht.

Die leicht löslichen Substanzen waren in physiologischer Kochsalzlösung, die schwer löslichen Substanzen in Aqua ex amp. gelöst.

Die schwerer löslichen Substanzen (192/188, 150/129, 43387) wurden entweder durch leichtes Anwärmen oder durch Ultraschall in Lösung gebracht.

Die zu untersuchenden Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und Carotisdurchfluß wurden bis zu 60 Minuten p. i. registriert. Für die Berechnung der Blutdruckmittelwerte wurden jeweils die maximalen Abweichungsdifferenzen der entsprechenden Parameter nach Substanzgabe gegenüber dem Ausgangswert verwendet.

Die Anzahl der Versuche betrug 4-6 pro Meßwert.

2.3.3.2.1 Ergebnisse der Blutdruckuntersuchungen von Pentamidin, 102/198, 192/188 und anderen Amidino- und Imidazolino-Verbindungen

Eine Übersicht der Ergebnisse, die durch die blutige Druckmessung im arteriellen und venösen System erhalten wurden, sowie die Registrierung der Herzfrequenz und des Carotisdurchflusses zeigen die Tab. 2.13 bis 2.15 und Abb. 2.16 bis 2.21.

Substanz	Konz. $\mu\text{Mol/kg KG}$	Veränderung Carotidsdruck (Mitteldruck) $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Carotidsfluß $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Abfall $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Anstieg $\% \pm \text{S.E.M.}$	Anzahl der Versuche (n)
Pentamidin	0,1	- 7,7 $\pm$ 2,0 + 10,7 $\pm$ 2,3	+ 34,0 $\pm$ 8,0	- 1,27 $\pm$ 0,09	+ 3,1 $\pm$ 0,7	4
	1	- 19,2 $\pm$ 1,9	- 37,9 $\pm$ 6,45		+ 10,5 $\pm$ 2,4	5
	10	- 40,5 $\pm$ 2,6	- 66,9 $\pm$ 8,5	- 3,2 $\pm$ 0,6	+ 12,7 $\pm$ 4,1	4
102 / 198	0,1	- 8,2 $\pm$ 1,2	+ 19,6 $\pm$ 2,2	- 2,6 $\pm$ 0,4	+ 3,5 $\pm$ 2,5	4
	1	- 24,0 $\pm$ 1,8	- 27,7 $\pm$ 5,2	- 9,7 $\pm$ 5,0	+ 2,3 $\pm$ 0,9	8
	10	- 41,3 $\pm$ 3,2	- 67,9 $\pm$ 4,8	- 4,9 $\pm$ 0,9	+ 8,2 $\pm$ 3,7	11
301 / 27	10	- 33,3 $\pm$ 2,1	- 58,9 $\pm$ 7,0	- 5,6 $\pm$ 1,4	+ 5,0 $\pm$ 2,3	7
	10	- 36,9 $\pm$ 4,5	- 57,4 $\pm$ 7,7		+ 9,6 $\pm$ 2,8	5
	1	- 29,9 $\pm$ 4,1	- 22,2 $\pm$ 6,5		+ 5,3 $\pm$ 2,6	5
150 / 129	10	- 60,5 $\pm$ 6,5	- 56,6 $\pm$ 12,5		+ 11,0 $\pm$ 5,9	4

Tab. 2.13 Einfluß verschiedener Diamidine auf Carotidsdruck, Carotidsfluß und Herzfrequenz (bei biphasischem Verlauf sind jeweils Abfall und Anstieg angegeben) der Ratte nach i. v.-Applikation; alle Werte entsprechen den prozentual maximalen Abweichungsdifferenzen; 0,1 $\mu\text{Mol/kg KG}$ PENTAMIDIN führen nach kurzzeitiger Drucksenkung (-) zu einer anhaltenden Druckerhöhung (+)

Substanz	Konz. $\mu\text{Mol/kg KG}$	Veränderung Carotidsdruck (Mitteldruck) $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Carotisfluß $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Abfall $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Anstieg $\% \pm \text{S.E.M.}$	Anzahl der Versuche (n)
261 / 115	10	- 35,5 $\pm$ 4,4	- 37,7 $\pm$ 5,6	- 1,6 $\pm$ 0,3	+ 10,7 $\pm$ 1,6	8
313 / 35	10	- 29,0 $\pm$ 2,7	- 32,8 $\pm$ 2,6	- 6,3 $\pm$ 1,9	+ 5,6 $\pm$ 3,3	4
314 / 44	10	- 25,3 $\pm$ 2,7	- 34,5 $\pm$ 3,9	- 7,1 $\pm$ 0,7		7
313 / 40	10	- 31,9 $\pm$ 3,7	- 40,5 $\pm$ 2,3	- 2,1	+ 8,4 $\pm$ 1,8	8
Diminacen	10	- 36,9 $\pm$ 2,5	- 49,3 $\pm$ 3,9	- 8,0 $\pm$ 1,1	+ 10,5 $\pm$ 5,1	6

Fortsetzung Tab. 2.13

313 / 24	10	- 18,7 $\pm$ 6,4 + 17,9 $\pm$ 3,4	+ 21,4 $\pm$ 6,5	- 6,45 $\pm$ 4,4	+ 6,9 $\pm$ 0,9	3
----------	----	--------------------------------------	------------------	------------------	-----------------	---

Tab. 2.14 Einfluß von 313/24 auf Carotidsdruck, Carotisfluß und Herzfrequenz der Ratte nach i. v.-Applikation; dargestellt sind jeweils prozentual maximale Abweichungsdivergenzen; nach kurzzeitiger Drucksenkung (-) führen 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ zu einer anhaltenden Drucksteigerung (+)

Substanz	Konz. $\mu\text{Mol/kg KG}$	Veränderung Carotidsdruck (Mitteldruck) $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Carotisfluß $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Abfall $\% \pm \text{S.E.M.}$	Veränderung Herzfrequenz Anstieg $\% \pm \text{S.E.M.}$	Anzahl der Versuche (n)
192 / 188	0,1	- 26,8 $\pm$ 3,7	- 27,3 $\pm$ 5,2	- 1,54 $\pm$ 0,45		4
	1	- 35,4 $\pm$ 4,6	- 34,7 $\pm$ 5,3	- 3,6 $\pm$ 1,2	+ 4,3 $\pm$ 0,3	6
	10	- 44,4 $\pm$ 3,2	- 60,0 $\pm$ 5,4	- 11,1 $\pm$ 4,0	+ 8,2 $\pm$ 1,3	9
297 / 150	10	- 23,8 $\pm$ 1,9	- 34,8 $\pm$ 3,8	- 6,7 $\pm$ 2,2	+ 14,3	4
261 / 116	10	- 38,2 $\pm$ 3,8	- 39,4 $\pm$ 1,3	- 3,13 $\pm$ 2,2	+ 22,6 $\pm$ 7,2	5
253 / 156	10	- 29,8 $\pm$ 3,1	- 26,9 $\pm$ 3,7	- 7,0 $\pm$ 1,6		10
43387 (Hoechst)	1	- 15,2 $\pm$ 1,7	- 21,7 $\pm$ 5,2	- 4,1 $\pm$ 2,6	+ 6,1 $\pm$ 2,1	6

Tab. 2.15 Einfluß verschiedener Diimidazolin-Verbindungen auf Carotidsdruck, Carotisfluß und Herzfrequenz der Ratte;
dargestellt sind jeweils prozentuale maximale Abweichungsdifferenzen

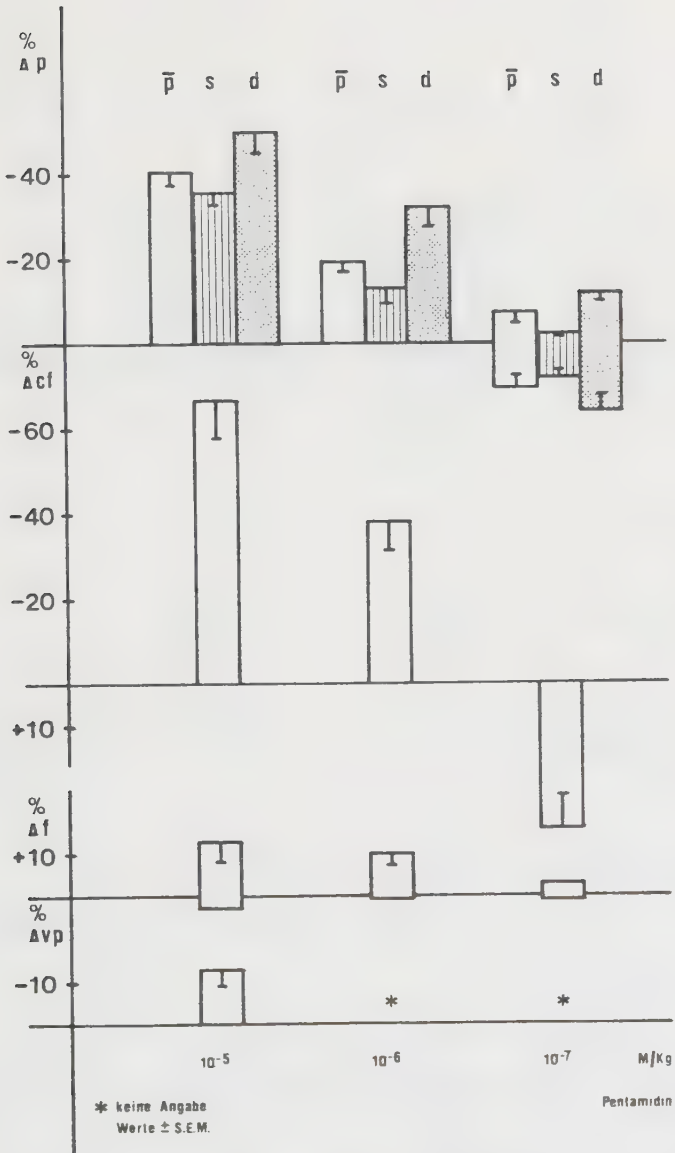


Abb. 2.16 Einfluß von PENTAMIDIN auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf), Herzfrequenz (f) und Venendruck (vp) der Ratte; $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

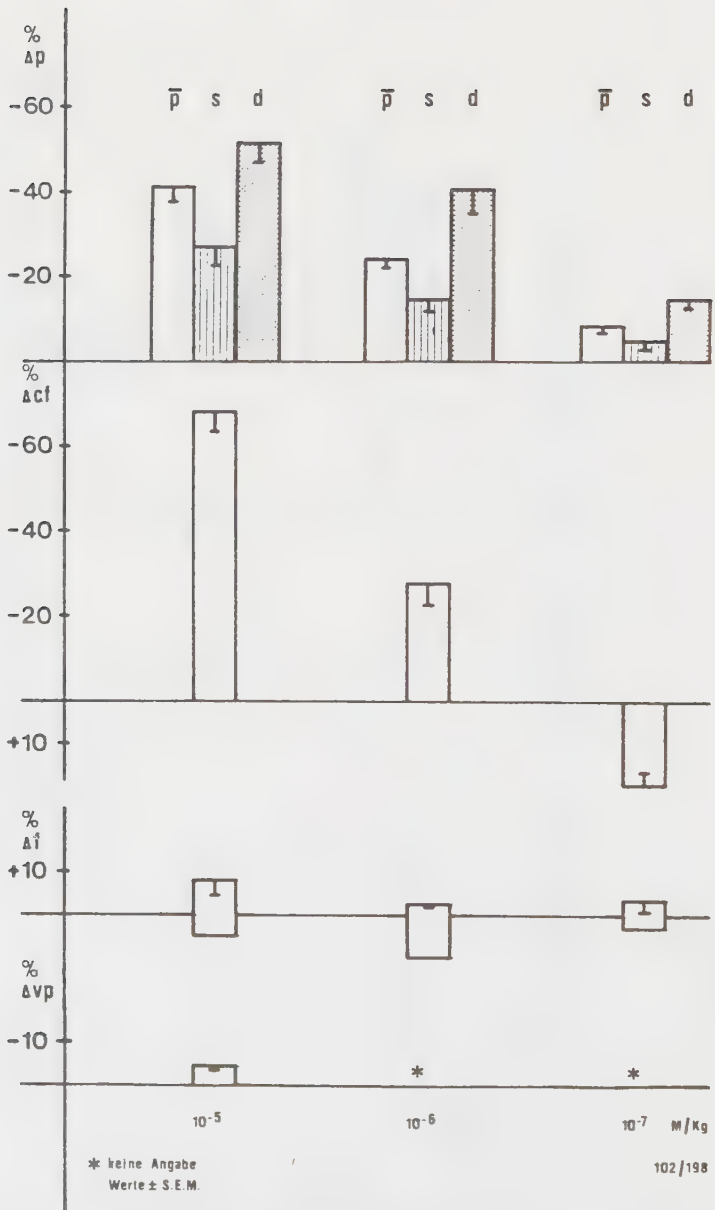


Abb. 2.17 Einfluß von 102/198 auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf), Herzfrequenz (f) und Venendruck (vp) der Ratte: $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

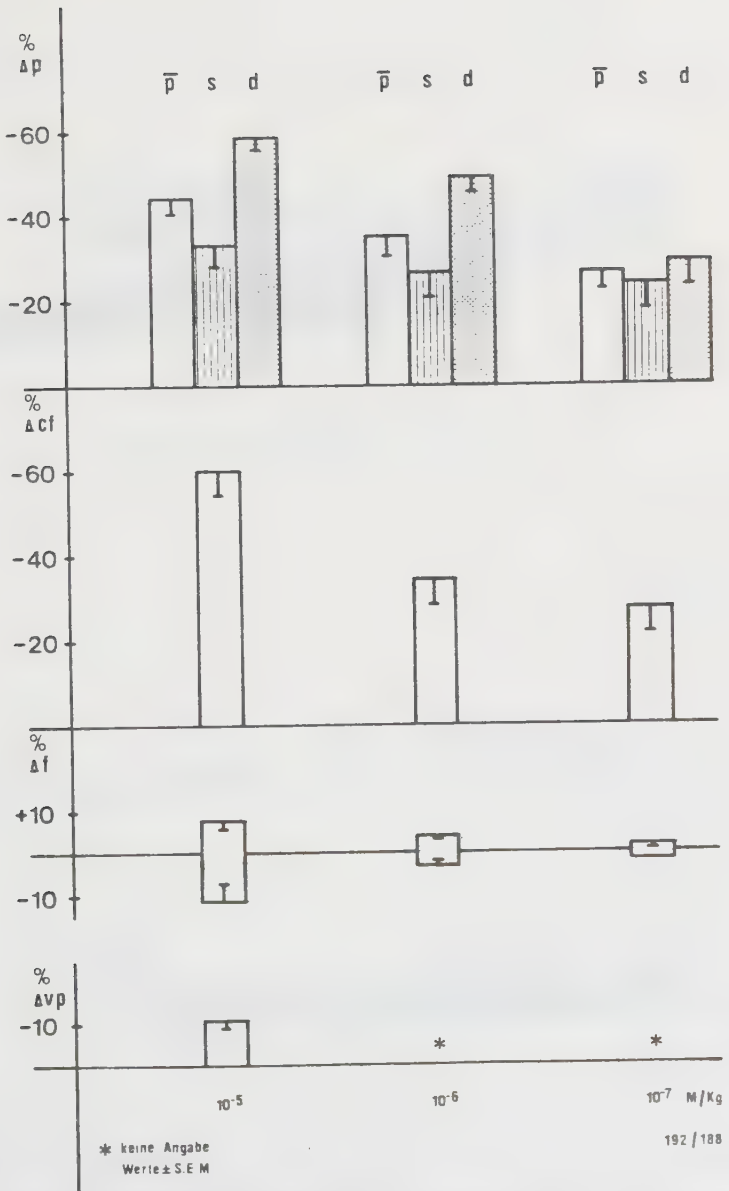


Abb. 2.18 Einfluß von 192/188 auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf), Herzfrequenz (f) und Venendruck (vp) der Ratte: $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

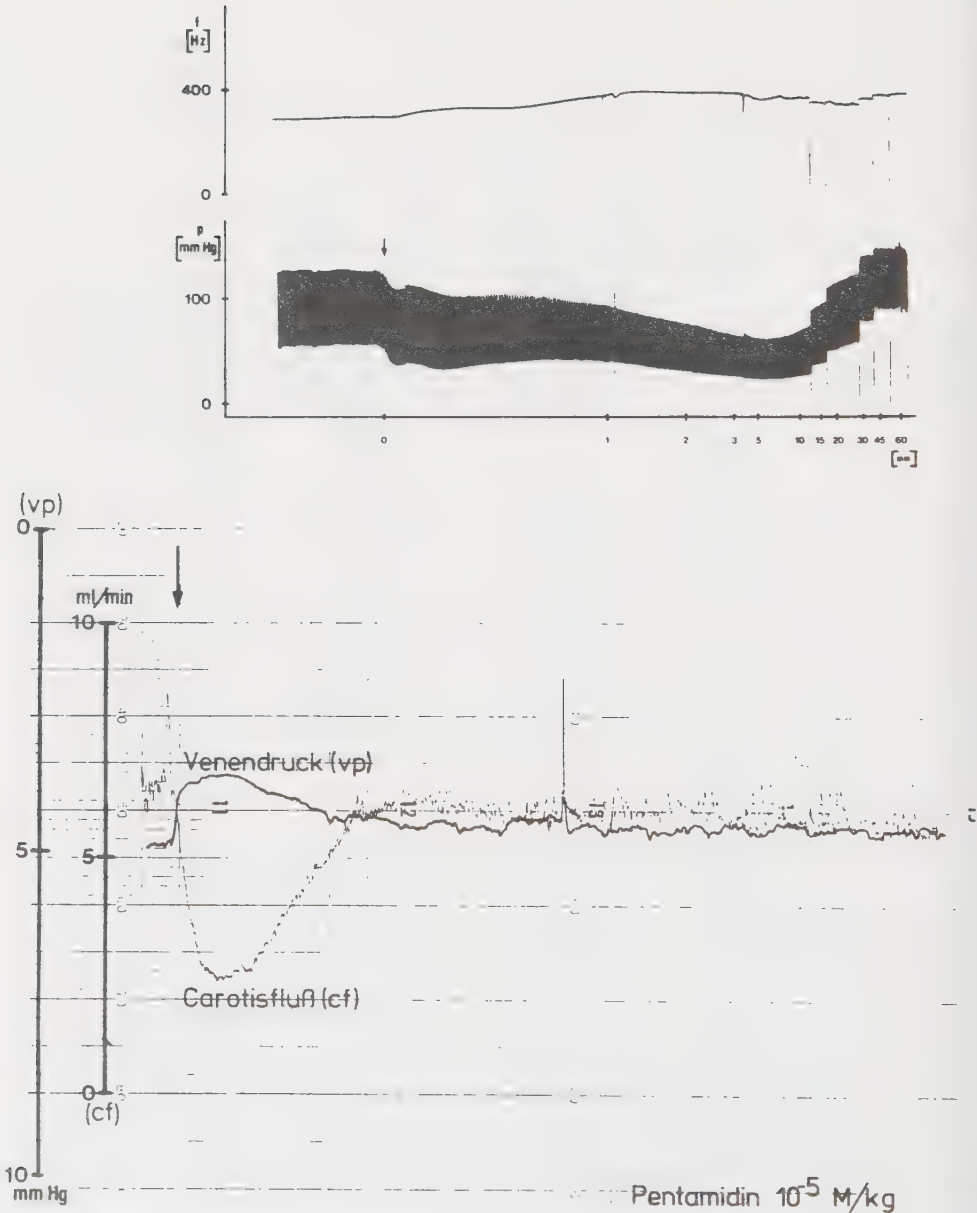


Abb. 2.19 Einfluß von $10 \mu\text{Mol/kg}$ KG PENTAMIDIN auf Carotisdruck (p), Herzfrequenz (f), Venendruck (vp) und Carotisfluß (cf) der Ratte; Pfeil ($\downarrow$): Zeitpunkt der Injektion; Beachte: Venendruck, ansteigende Kurve bedeutet Druckabfall

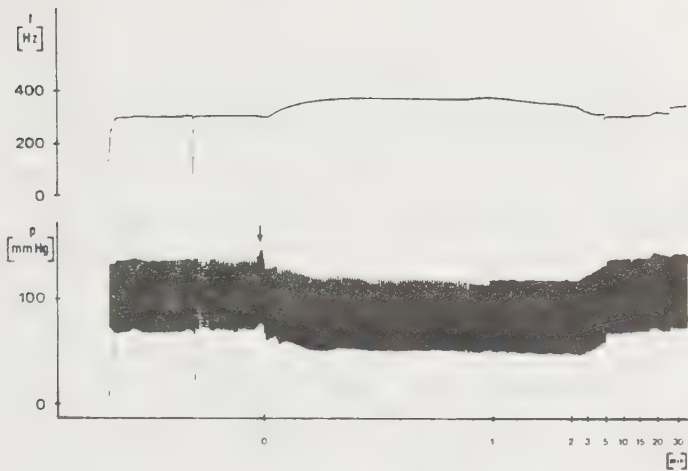


Abb. 2.20a Einfluß von 1 $\mu\text{Mol/kg}$ KG PENTAMIDIN auf Carotisdruck (p) und Herzfrequenz (f) der Ratte;
Pfeil ($\downarrow$): Zeitpunkt der Injektion

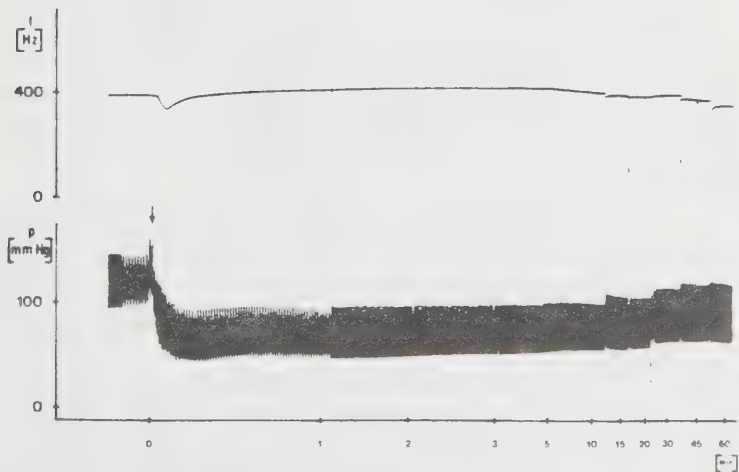


Abb. 2.20b Einfluß von 10 $\mu\text{Mol/kg}$ KG 102/198 auf Carotisdruck (p) und Herzfrequenz (f) der Ratte;
Pfeil ($\downarrow$): Zeitpunkt der Injektion

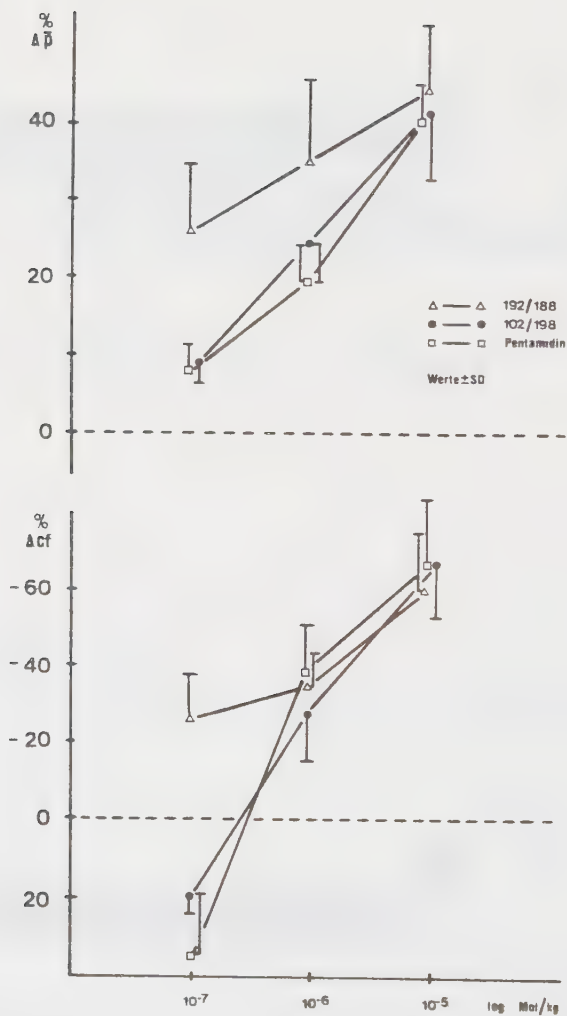


Abb. 2.21 Einfluß steigender Dosen PENTAMIDIN, 102/198 und 192/188 auf Carotisdruk (p) und Carotisfluß (cf) der Ratte; aufgetragen sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

2.3.3.2.1.1 Arterieller Mitteldruck ($\bar{p}$), systolischer Druck (s) und diastolischer Druck (d)

Auffallendes Merkmal bei allen Druckversuchen war eine Zunahme der Blutdruck-Amplitude nach der Injektion der Diamidine.

Wie aus den oben beschriebenen Screeningversuchen hervorgeht, war die Blutdrucksenkung nach Pentamidin, 102/198 und 192/188 qualitativ sehr ähnlich.

Bei Pentamidin ergab sich bei einer Dosierung von 0,1 $\mu\text{Mol/kg KG}$ neben einer anfänglichen kurzen Drucksenkung eine mäßige, länger anhaltende Drucksteigerung. Ähnlich waren die Ergebnisse, die nach Gabe der Substanz 313/24, einem Amidoxim, bei einer Dosierung von 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ erhalten wurden. Auch hier kam es nach kurzem initialen Absenken des Druckes zur Drucksteigerung.

Der stärkste hypotensive Effekt konnte bei einer Dosierung von 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ bei der relativ schwer löslichen Substanz 150/129 festgestellt werden.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen Diamidino- und Diimidazolino-Verbindungen in ihrer Wirkung auf die Blutdruckregulation konnte nicht dargestellt werden, wenngleich die homologen Imidazolin-Verbindungen den diamidino-substituierten Verbindungen gegenüber (102/198 und 192/188, 261/115 und 261/116) einen etwas stärkeren Effekt zu haben scheinen.

Als besonders toxisch erwies sich 43387 (Hoechst), das maximal nur bis 7,5 $\mu\text{Mol/kg KG}$ dosiert werden konnte. Höhere Dosen führten zum sofortigen Exitus der Tiere.

Bei allen Verbindungen sank der diastolische Druck (d) stärker ab als der systolische (s), was auf eine gefäßdilatatorische Wirkung hindeutet.

2.3.3.2.1.2 Herzleistung, Flußminutenvolumen in der A. carotis (cf)

Unter Einwirkung der meisten untersuchten trypanociden Diamidine v e r m i n d e r t e sich die Herzleistung dosisabhängig.

Eine Ausnahme hiervon machten Pentamidin und 102/198 bei einer Dosis von 0,1 $\mu\text{Mol/kg KG}$ und 313/24, welches noch bei Applikation von 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ die Herzpumpleistung s t e i g e r t e , also positiv inotrop wirkte.

2.3.3.2.1.3 Herzfrequenz (f)

Die Herzfrequenz veränderte sich bei fast allen getesteten Substanzen biphasisch. Kurz nach der Injektion der Verbindungen kam es meist zu einem A n s t i e g der Herzfrequenzen, der wohl als reflektorische Tachycardie auf die Blutdrucksenkung zu deuten ist.

Im Laufe von 20-60 Minuten ging dieser Anstieg zurück und ging in der Regel in v e r m i n d e r t e Frequenzen über.

253/156 und 314/44 führten nur zu Frequenzen, die unter dem Ausgangswert lagen.

2.3.3.2.1.4 Venendruck (vp)

Eine Einflußnahme auf die Wandspannung des Herzens über eine Reduktion des venösen Rückstroms (venous pooling) ist in der Form der "Nitrit-Therapie" durchaus üblich (Preload-Reduktion). Im Zuge des verminderten venösen Rückstroms zum Herzen kommt es neben einer verminderten Wandspannung zur Abnahme des Schlagvolumens und zum Absinken des arteriellen Druckes.

Inwieweit trypanocide Diamidine den Venendruck vermindern, sollte durch Messungen geklärt werden.

Hierzu wurde ein Katheter über die V. femoralis bis zur Einmündung in die V. cava vorgeschoben (s. auch Kap. 4.7.2). In der Regel betrug der Druck hier 4-7 mm Hg.

Für Pentamidin, 102/198 und 192/188 konnten nach Gabe von 10 $\mu\text{Mol/kg}$ KG Druckabfälle zwischen 10 und 15% vom Ausgangsdruck festgestellt werden (s. Abb. 2.16, 2.17, 2.18).

Im Vergleich zur arteriellen Druckabnahme bei gleicher Dosis war dies ein geringer Effekt, was darauf hindeutete, daß der Hauptangriffspunkt am Gefäß wahrscheinlich auf der arteriellen Seite lag.

2.3.3.3 Blutige Druckmessung mit Vorbehandlung

Der aus der Literatur (65,193,239) bekannte und in den Screeningversuchen angedeutete, protektive Effekt von Noradrenalin bzw. Adrenalin gegenüber der Blutdrucksenkung nach Applikation von Diamidinen sollte anhand der Substanzen 102/198 und 192/188 überprüft werden. Da Noradrenalin und Adrenalin neben ihrer α -rezeptorstimulierenden Eigenschaft (Konstriktion der Gefäße) über β_1 -Rezeptoren gleichzeitig eine positiv inotrope Wirkung am Herzen entfalten, wurde zur Abklärung einer Gefäßwirkung ein α -Sympathomimetikum ohne direkte Herzwirkung, nämlich Oxymetazolin, vorgezogen.

2.3.3.3.1 102/198 und 192/188 vorbehandelt mit
Oxymetazolin

Oxymetazolin ist ein nichtselektiver α_1 - und α_2 -Agonist mit leicht höherer Affinität zu α_2 -Adrenorezeptoren (216). Die Substanz kann eine vasale Wirkung, im Sinne einer Dilatation durch Blockade vasokonstriktiver α -Adrenorezeptoren, gegenteilig beeinflussen. Im Handel befinden sich nur Präparate zur lokalen Applikation als Rhinologika. Wird es intravenös verabreicht, kommt es zur allgemeinen Gefäßkonstriktion.

Für die Versuche wurden von Oxymetazolin die drei Konzentrationen 50, 75 und 100 nMol/kg KG verwendet, die unmittelbar vor Injektion der zu untersuchenden Substanzen i. v. gegeben wurden.

Eine Prämedikation mit höheren Dosen wurde von den Versuchstieren in der Regel nicht toleriert, da es unmittelbar nach der Injektion zu exzessiven Drucksteigerungen kam, die selbst durch sofortige Injektion der drucksenkenden Versuchssubstanzen nicht beherrschbar waren.

102/198 und 192/188 wurden in einer Konzentration von 10 μ Mol/kg KG gegeben. Das Injektionsvolumen überstieg nicht 0,5 ml/250 g Versuchstier.

Die Anzahl der Versuche betrug 4-5 pro Meßwert. Der Versuchsablauf war wie unter 2.3.3.2 beschrieben. Wegen der massiven Drucksteigerung und des gegenregulatorischen Absinkens der Herzfrequenzen durch Oxymetazolin wurden die Injektionslösungen von 102/198 und 192/188 unmittelbar nach Beendigung von Oxymetazolin-Injektion über den gleichen Katheter verabreicht.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.22 und 2.23 sowie in Tab. 2.24 wiedergegeben.

Bei 102/198 führte Oxymetazolin sowohl systolisch als

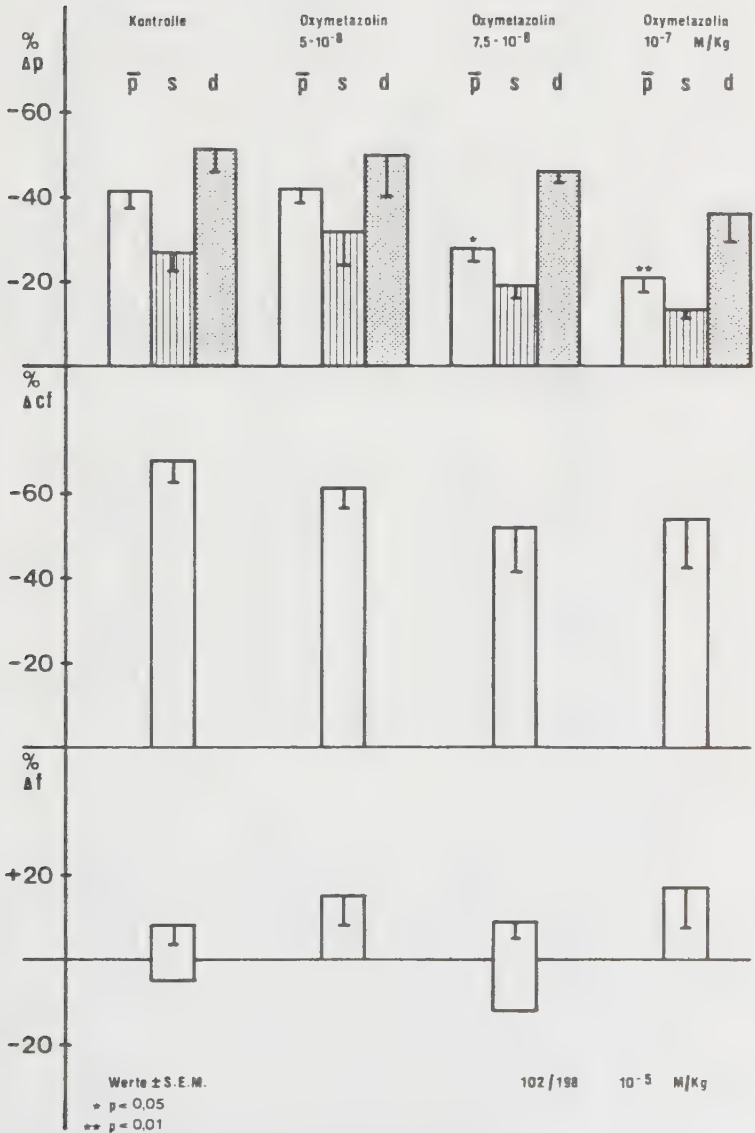


Abb. 2.22 Einfluß von 102/198 auf Carotidfluß (cf) und Herzfrequenz (f) der Ratte nach Vorbehandlung mit Oxytelazolin; $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

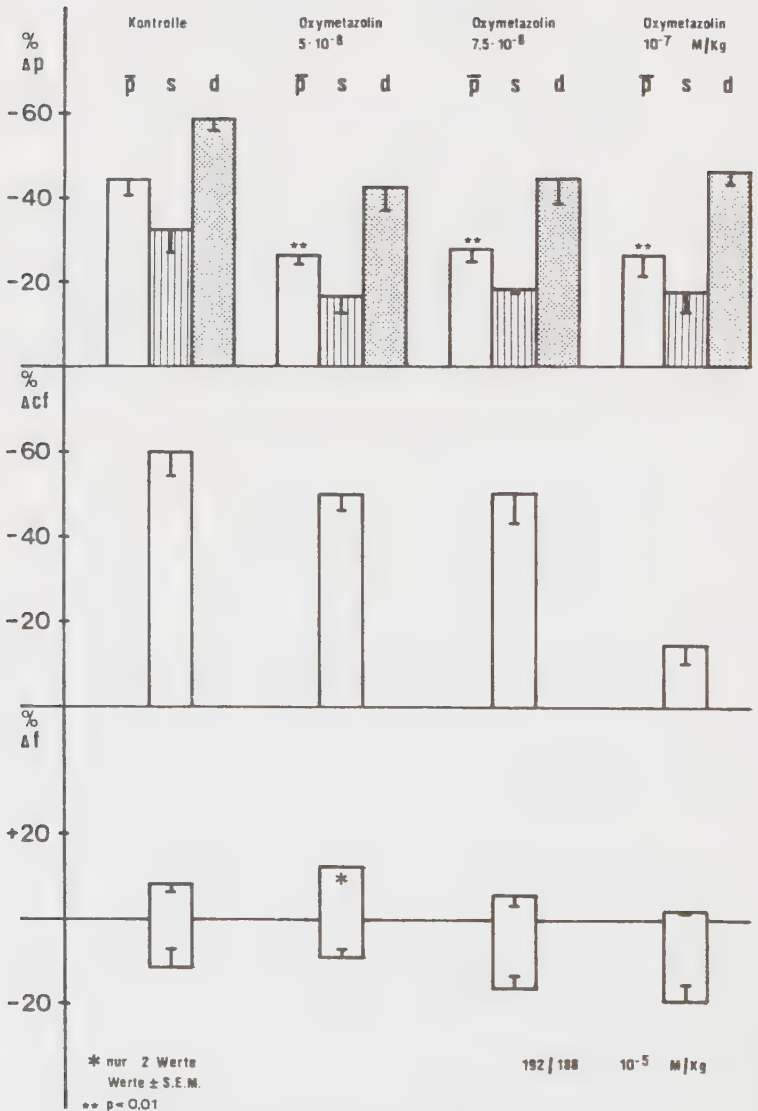


Abb. 2.23 Einfluß von 192/188 auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf) und Herzfrequenz (f) der Ratte nach Vorbehandlung mit Oxy-metazolin; $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

102/198 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$

Oxymetazolin n Mol/kg KG	Carotismitteldruck % $\pm$ S.E.M.	Herzfrequenz % $\pm$ S.E.M.	Carotisfluß % $\pm$ S.E.M.	Anzahl d. Versuche
ohne	-41,3 $\pm$ 3,2	+ 8,2 $\pm$ 3,7 - 4,9 $\pm$ 0,9	-67,9 $\pm$ 4,8	11
50	-42,3 $\pm$ 2,6	+ 15,2 $\pm$ 6,7	-61,6 $\pm$ 4,1	10
75	-27,8 $\pm$ 2,7	+ 8,7 $\pm$ 6,1	-52,4 $\pm$ 10,2	4
100	-21,2 $\pm$ 3,1	+ 17,7 $\pm$ 9,1	-54,1 $\pm$ 11,7	5

192/188 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$

ohne	-44,4 $\pm$ 3,2	+ 8,2 $\pm$ 1,3 - 11,1 $\pm$ 4,0	-60,0 $\pm$ 5,4	9
50	-26,3 $\pm$ 1,9	- 8,5 $\pm$ 1,9	-50,3 $\pm$ 3,8	4
75	-28,0 $\pm$ 2,3	- 16,2 $\pm$ 2,9	-50,3 $\pm$ 6,8	5
100	-26,3 $\pm$ 4,2	- 19,2 $\pm$ 3,4	-14,8 $\pm$ 4,0	4

Tab. 2.24

auch diastolisch zu einer dosisabhängigen Reduktion des ohne Vorbehandlung durch 102/198 erzeugten Druckabfalls von ca. 40%.

Bei 192/188 zeigte Oxymetazolin diesen dosisabhängigen Effekt im gewählten Dosisbereich nicht. Hier ergab sich mit allen drei Konzentrationen in etwa der gleiche Druckabfall.

Die Herzfrequenzen zeigten nach Oxymetazolin-Vorbehandlung bei 102/198 und 192/188 gegenüber den nicht vorbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede.

Nach Gabe von 102/198 stand die bereits erwähnte reflektorische Gegenregulation im Sinne einer Frequenzsteigerung im Vordergrund.

192/188 zeigte bei einer Dosierung von 100 nMol/kg KG Oxymetazolin eine verstärkte Tendenz zu niedrigeren Frequenzwerten.

Der Abfall des Carotisdurchflußminutenvolumens konnte bei 102/198 im Vergleich zur Kontrolle ohne Vorbehandlung mit Oxymetazolin nicht signifikant antagonisiert werden. Bei 192/188 führte Oxymetazolin bei der höchsten Dosis von 100 nMol/kg KG zu einer deutlichen Reduktion des depressiven Effektes.

2.3.3.3.1.1 Zusammenfassung der Oxymetazolin-Versuche

Aus den Ergebnissen der Oxymetazolin-Vorbehandlung können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die durch trypanocide Diamidine und Diimidazoline hervorgerufene Blutdrucksenkung kann durch das α -Sympathomimetikum Oxymetazolin teilweise antagonisiert werden, was für einen Angriff der Diamidine am Gefäßsystem, möglicherweise vermittelt über adrenerge α -Rezeptoren, spricht.

2. Die verminderte Herzleistung, gemessen am Carotisfluß, konnte bis auf eine Ausnahme nicht signifikant verbessert werden, was einen weiteren Angriffspunkt der Verbindungen am Herzen möglich erscheinen läßt.

2.3.3.3.2 Histaminreaktiver Effekt bei Pentamidin; Antagonismus mittels Mepyramin und Cimetidin

Gleichfalls wichtig erschien es, die im Screening-Versuch nicht getestete histaminliberierende Wirkung von Pentamidin auf ihre Bedeutung hin zu überprüfen und eventuell andere Angriffspunkte auszuschließen.

2.3.3.3.2.1 Histaminantagonismus - Kontrolle

Histamin verursacht bei intravenöser Applikation einen Blutdruckabfall, der bei hohen Dosen mit den klassischen H_1 -Blockern, wie Mepyramin, nicht vollständig antagonisierbar ist (48,196). Erst die Kombination eines H_1 - mit einem H_2 -Blocker, wie Cimetidin, bringt einen vollständigen Antagonismus (196).

Zur Überprüfung der Validität des Modells wurde vor dem Hauptversuch ein Kontrollversuch mit Histamin durchgeführt.

Die Tiere wurden narkotisiert und wie zur blutigen Druckmessung vorbereitet. Die Injektion der Histaminlösung erfolgte über einen Femoralis-Katheter.

Mepyramin wurde in einer Dosierung von 5 $\mu\text{Mol/kg KG}$ 30 Minuten vor der Histamin-Applikation i. p. und Cimetidin ¹⁾ 2 Minuten vorher in einer Konzentration von 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ i. v. verabreicht.

Die Histamindosen betrugen 0,1, 1,0 oder 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten der Blutdruck registriert.

Pro Meßpunkt wurden 4-5 Versuchstiere verwendet.

¹⁾ Fa. MSD stellte für die Versuche Cimetidin freundlicherweise kostenlos zur Verfügung.

Aus den gemessenen Differenzen des Blutdruckes wurden jeweils eine Dosis-Wirkungs-Kurve ohne und mit Vorbehandlung aufgenommen, zu deren Berechnung die über den entsprechenden Zeitraum registrierten maximalen Abweichungen herangezogen wurden.

Das Ergebnis dieses Versuches entsprach der erwarteten Reduktion des Blutdruckabfalls nach Gabe einer Histaminlösung durch die gewählte H_1 -, H_2 -Antagonisten-Kombination, die in den Bereichen 1,0 - 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ den Druckabfall um ca. 65% bzw. um 43% reduzierte (s. Tab. 2.25).

In Abb. 2.26 sind die mittleren Druckdifferenzen in Abhängigkeit von der Histamindosis aufgetragen.

Deutlich ist die zu erwartende Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve sichtbar, d. h. um eine gleich hohe Blutdrucksenkung auszulösen, müssen nach Vorbehandlung wesentlich höhere Histamin-Dosen verwendet werden.

Die Parallelität der Kurven ist außerdem ein Zeichen für einen kompetitiven Mechanismus.

Ein Frequenzanstieg, der nach Histamingabe ohne Vorbehandlung sichtbar war, konnte vollständig antagonisiert werden.

Das Absinken der Herzleistung nach einer Dosis von 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$ Histamin konnte durch die beiden Antagonisten um 70% reduziert werden.

Mepyramin 5 μ Mol/kg KG
 Cimetidin 10 μ Mol/kg KG

Histamin [μ Mol/kg KG]	Carotismitteldruck % $\pm$ S.E.M.		Herzfrequenz % $\pm$ S.E.M.		Carotisfluß % $\pm$ S.E.M.	
	ohne	mit Vorbeh.	ohne	mit Vorbeh.	ohne	mit Vorbeh.
10	-31,4 $\pm$ 2,9	-18,1 $\pm$ 0,9	+7,0 $\pm$ 1,4	+ 0	-58,9 $\pm$ 6,7	-18,2 $\pm$ 5,5
1	-22,1 $\pm$ 2,0	- 7,9 $\pm$ 1,1	+6,8 $\pm$ 0,8	+ 0	-38,0 $\pm$ 9,6	+22,5 $\pm$ 13,0
0,1	-15,5 $\pm$ 3,4	---	+6,1 $\pm$ 0,2	---	-20,3 $\pm$ 5,8	---

Tab. 2.25

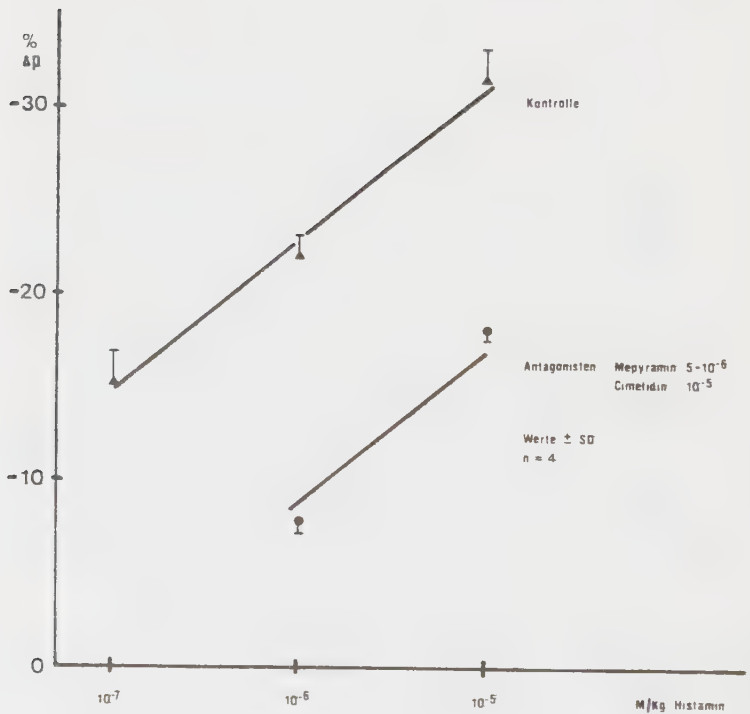


Abb. 2.26 Kontrollversuch
Einfluß von Histamin ($\blacktriangle$) auf den Blutdruck der Ratte;
nach Vorbehandlung mit Mepyramin und Cimetidin ($\bullet$)
deutlich verringerte Blutdruckeffekte

2.3.3.3.2.2 Pentamidin, Vorbehandlung mit Mepyramin und Cimetidin

Unter gleichen Bedingungen wie o. a. wurde versucht, die durch Pentamidin ausgelöste Blutdrucksenkung mit den genannten H_1 -/ H_2 -Antagonisten, bei gleicher Dosierung, aufzuheben.

Tab. 2.27 und Abb. 2.28 zeigen die Ergebnisse.

Die Blutdrucksenkung durch 10 $\mu\text{Mol/kg}$ KG Pentamidin konnte mit den vorgegebenen Antihistaminika signifikant ($p < 0,05$) verringert werden. Auffallend war der prozentual etwas höhere Effekt auf den systolischen Druckwert. Der diastolische Wert war weniger beeinflussbar, obwohl sich eine geringe Reduktion noch nachweisen ließ. 1 $\mu\text{Mol/kg}$ KG Pentamidin setzt wahrscheinlich so wenig Histamin frei, daß dieses für das Ausmaß der Blutdrucksenkung nicht ausschlaggebend ist.

Die durch 10 $\mu\text{Mol/kg}$ KG Pentamidin verminderte Herzleistung verbesserte sich nach Vorbehandlung mit den beiden Histaminrezeptor-Antagonisten um ca. 30% gegenüber dem Kontrollwert, ein Effekt, der auch bei der Erstellung der Histamin-Kontrollkurve (Kap. 2.3.3.3.2.1) sichtbar wurde.

Bei einer Dosierung von 0,1 $\mu\text{Mol/kg}$ KG Pentamidin konnte an der Herzleistung nach Vorbehandlung, im Vergleich zum Kontrollwert ohne Vorbehandlung, kein Unterschied festgestellt werden.

Die Herzfrequenzen lagen nach einer Prämedikation mit den H_1 -/ H_2 -Antagonisten unverändert, gegenüber den nur mit Pentamidin behandelten Versuchstieren, im Streubereich.

Bei allen Versuchen kam es zum Anstieg der Frequenzen.

Mepyramin 5 $\mu\text{Mol/kg KG}$
 Cimetidin 10 $\mu\text{Mol/kg KG}$

Pentamidin [$\mu\text{Mol/kg KG}$]	Carotismitteldruck % $\pm$ S.E.M.		Herzfrequenz % $\pm$ S.E.M.		Carotisfluß % $\pm$ S.E.M.	
	ohne	mit Vorbeh.	ohne	mit Vorbeh.	ohne	mit Vorbeh.
10	-40,5 $\pm$ 2,6	-24,1 $\pm$ 3,5	+12,7 $\pm$ 4,1	16,1 $\pm$ 10,5	-66,9 $\pm$ 8,5	-48,8 $\pm$ 4,5
1	-19,2 $\pm$ 1,9	-15,2 $\pm$ 1,6	+10,5 $\pm$ 2,4	10,5 $\pm$ 1,0	-37,9 $\pm$ 6,5	-40,7 $\pm$ 10,8

Tab. 2.27

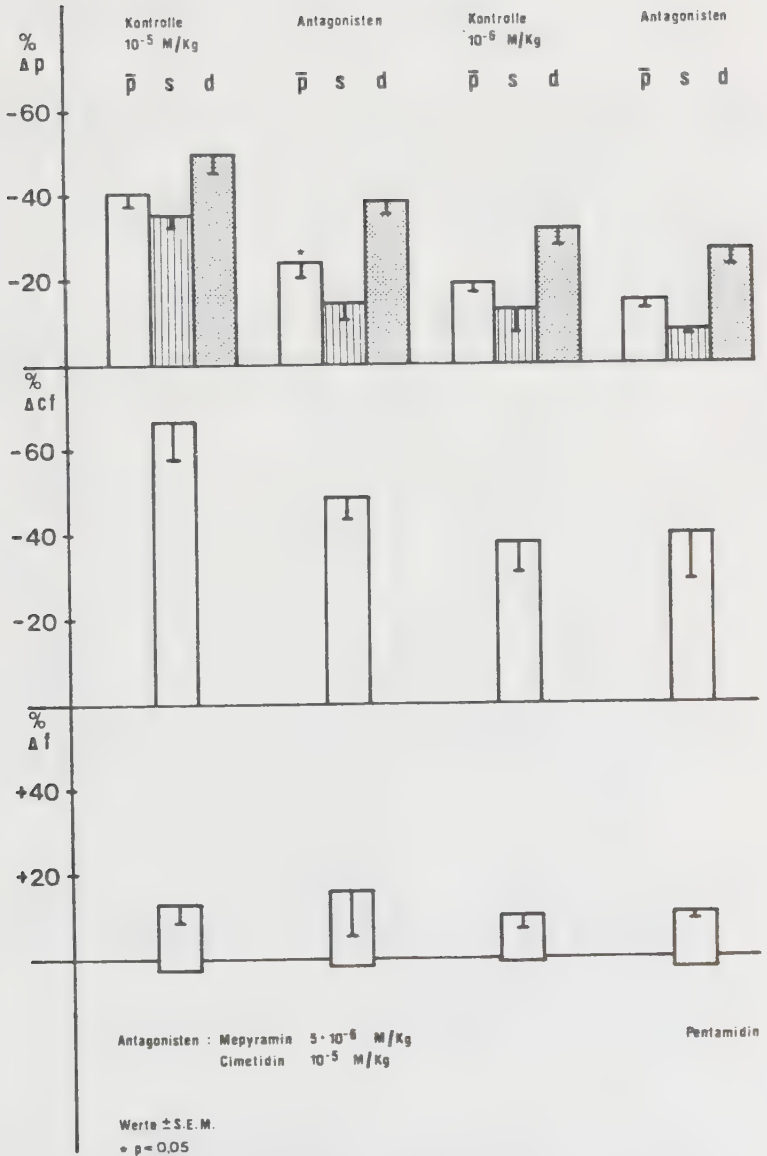


Abb. 2.28 Einfluß von PENTAMIDIN auf Carotiddruck (cf) und Herzfrequenz (f) der Ratte nach Vorbehandlung mit Antihistaminika; $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

2.3.3.3.2.3 Pentamidin und Di-Natriumcromoglycat,
DSCG

DSCG (Abb. 2.30) verhindert eine durch Antigen bzw. Pharmaka (Substanz 48/80) induzierte Mastzellen-degranulation (46,47,161). Es sollte also zumindest in hohen Dosen auch eine Degranulation verhindern, wenn Pentamidin direkt auf die Mastzellenmembran einwirkt.

Zur vorliegenden Fragestellung wurden 10, 20 und 40 mg/kg KG DSCG, gelöst in Aqua ex amp., unmittelbar vor Pentamidingabe (10 μ Mol/kg KG i. v.) verabreicht. Anschließend wurde der Blutdruck über 30 bis 60 Minuten registriert.

Die Anzahl der Versuche betrug 3-4 pro Meßwert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.24 aufgezeigt.

Hierbei zeigte sich, daß DSCG in keiner der verwendeten Dosen eine signifikante Wirkung auf die durch Pentamidin bewirkte Blutdrucksenkung hatte. Bereits 10 mg/kg KG reduzierten die systolische D r u c k - s e n k u n g nicht signifikant um ca. 7% (berechnete Mittelwerte). Eine größere Effizienz war auch mit höheren Dosen nicht zu erreichen. Der diastolische Druckabfall war hier ebenso wenig beeinflußt wie derjenige nach Vorbehandlung mit H_1 -/ H_2 -Antagonisten. H e r z l e i s t u n g und H e r z f r e q u e n z lagen unverändert im Streubereich.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob evt. andere Mastzelleninhaltsstoffe für die Blutdrucksenkung ausschlaggebend sind.

Dazu wurden Versuche mit dem Leukotrien-Antagonisten FPL 55712 unternommen.

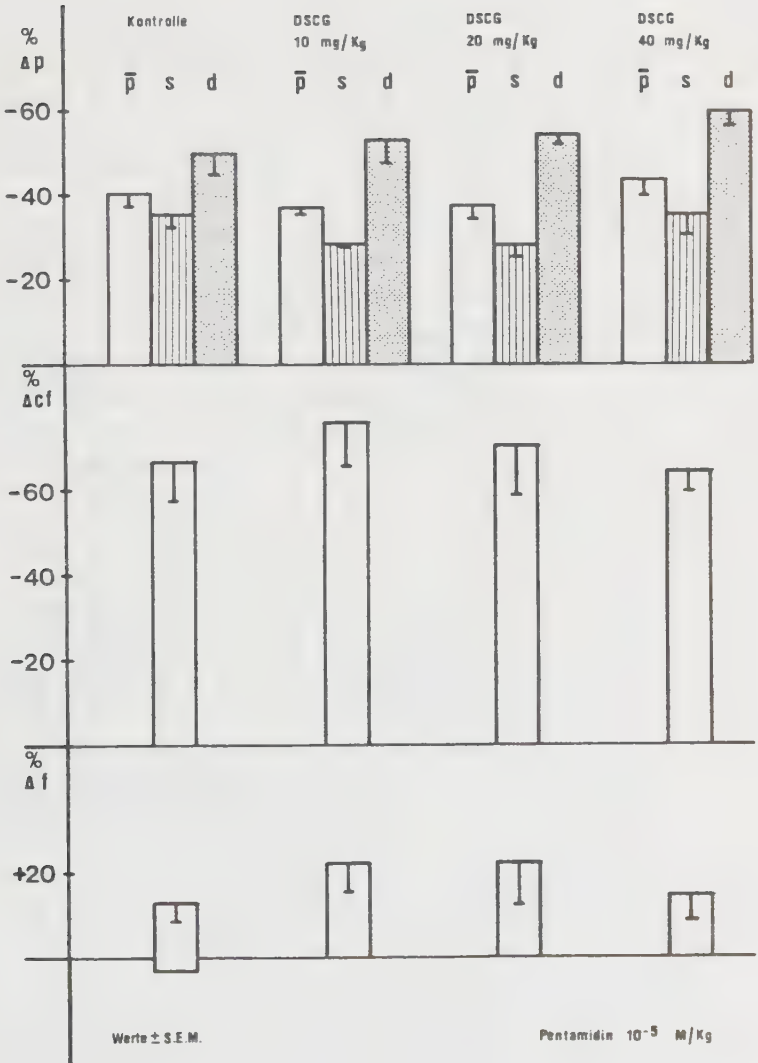
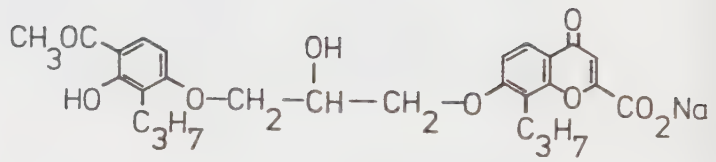
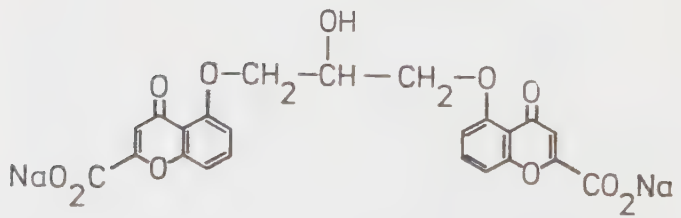


Abb. 2.29 Einfluß von PENTAMIDIN auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf) und Herzfrequenz (f) der Ratte nach Vorbehandlung mit DSCG; p̄ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert



FPL 55712



Cromoglicinsäure -Na₂

2.3.3.3.2.4 Leukotrien-Antagonist FPL 55712

Eine Freisetzung von Leukotrienen (SRS-A) aus Mastzellen, deren Degranulation (in vitro und in vivo) z. B. durch ein Antigen verursacht wird, konnte mehrfach bewiesen werden (186,225).

Eine Interaktion von Pentamidin mit der Mastzellenmembran sollte also nicht nur Histamin freisetzen, sondern auch andere in den Mastzellen vorhandene Substanzen, wie z. B. SRS-A (Slow-Reacting-Substance of Anaphylaxis). Diese Bezeichnung stand lange Zeit für bestimmte Umbauprodukte der Arachidonsäure (246), die sogenannten *L e u k o t r i e n e*. Wie sich herausstellte, ist SRS-A ein Gemisch aus mehreren, verschiedenen Leukotrienen, wie LTC₄ und LTD₄ (186).

In ihrem pharmakologischen Verhalten sind die Leukotriene dem Histamin ähnlich. Sie bewirken sowohl eine Permeabilitätserhöhung, Kontraktion und/oder Dilatation der Gefäße, als auch eine Kontraktion der Bronchialmuskulatur (186) und senken offensichtlich in höheren Dosen, nach einer kurzen Blutdruckerhöhung p. i., anhaltend den Druck ab (64,200).

FPL 55712 (Abb. 2.30) ist ein selektiver Antagonist gegen die SRS-A-Leukotriene LTC₄ und LTD₄ (41,186, 246) und sollte eine vaskuläre Reaktion auf freigesetzte Leukotriene verhindern.

Die Substanz wurde 15 Minuten vor der Pentamidin-Injektion intravenös in Konzentrationen von 0,5 und 1 mg/kg KG verabreicht. Nach *S c h i a n t a r e l l i et al.* (200) reichen diese Konzentrationen aus, um einen durch 0,8 nMol/kg KG LTC₄ ausgelösten hypotensiven Effekt um ca. 70% zu verringern.

Von Pentamidin wurden 10 µMol/kg KG, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, ebenfalls i. v. gegeben und der Blutdruck 30-60 Minuten registriert.

Pro Meßwert wurden 3 Versuchstiere verwendet.

Das Ergebnis zeigt Abb. 2.31.

Es konnten weder beim Carotisdruck noch bei der Herzleistung oder der Herzfrequenz signifikante Veränderungen, im Vergleich zum Kontrollwert ohne FPL-Behandlung, festgestellt werden.

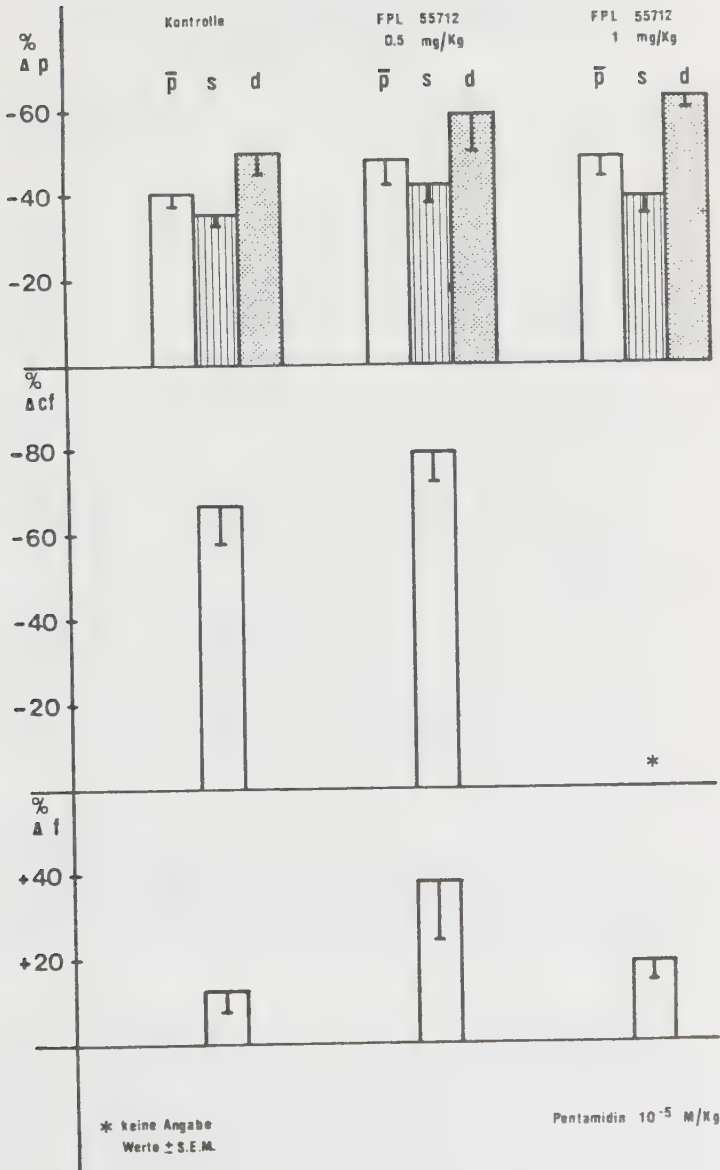


Abb. 2.31 Einfluß von PENTAMIDIN auf Carotisdruck (p), Carotisfluß (cf) und Herzfrequenz (f) der Ratte nach Vorbehandlung mit FPL 55712; $\bar{p}$ = Mitteldruck, s = systolischer Druck, d = diastolischer Druck; dargestellt sind die Differenzwerte (Δ) zum Kontrollwert

2.3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der blutigen Druckmessung

Zusammenfassend können aus den Versuchen mit der blutigen Druckmessung folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die untersuchten trypanociden Diamidine senken dosisabhängig Blutdruck und Herzleistung (Carotisdurchflußminutenvolumen); p. i. kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz, oftmals gefolgt von einer Verminderung der Herzfrequenz.
2. Der Venendruck sinkt geringfügig ab.
3. Oxymetazolin kann den vasalen Anteil an der Blutdrucksenkung auffangen.
4. Die durch Pentamidin bedingte Drucksenkung kann zum Teil durch H_1 -/ H_2 -Antagonisten vermindert werden.
5. DSCG und FPL 55712 zeigen keinen antagonistischen Effekt, woraus man schließen könnte, daß nicht freigesetztes Histamin für die Drucksenkung verantwortlich ist, sondern daß u. U. eine direkte Rezeptorerregung durch die getestete Substanz stattfindet.

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, zunächst den vasalen Angriffspunkt mittels einer isolierten Gefäßpräparation besser darzustellen und anschließend den Mechanismus der verminderten Herzleistung zu untersuchen.

2.4 Untersuchungen zur Gefäßwirkung verschiedener trypanocider Diamidine an der isolierten Aorta des Meerschweinchens in vitro

Gefäße, insbesondere arterielle Blutgefäße, sind durch ihre Muskulatur befähigt, ihre Lumenweite zu regulieren. Dies geschieht physiologisch hauptsächlich durch nervale Einflüsse des vegetativen Nervensystems. Hierbei führt eine α -Rezeptorerregung zu Vasokonstriktion, β_2 -Rezeptorerregung zu Vasodilatation. Daneben gibt es jedoch noch andere Regulationsmechanismen und Einflüsse, die auf die Gefäßmuskulatur kontrahierend und dilatierend einwirken können (Adenosin-Autoregulation bei Hypoxie, Vasopression, Histamin, Kinine, Hormone).

Wie aus den vorangegangenen Versuchen am Ganztier deutlich wurde, kommt es nach Applikation drucksenkender Pharmaka normalerweise zu Gegenregulationen, über die der Organismus den Druckabfall auszugleichen versucht (z. B. Tachycardie).

Zur Untersuchung von Interaktionen bestimmter Pharmaka mit Rezeptoren des vegetativen Nervensystems werden daher isolierte Gefäßpräparate herangezogen, da in diesem Fall die nervale oder humorale Gegenregulation entfällt und die Effekte deutlicher sichtbar werden.

Als Standardmodell für die Untersuchungen der Wirkungen verschiedener Pharmaka auf arterielle Blutgefäße, rezeptorgebunden oder direkt, wird oftmals die von F u r c h g o t t (83) eingeführte Aortenspirale verwendet.

Mit diesem Modell wurde in den eigenen Experimenten geprüft, ob die Diamidine und Diimidazoline über einen α -Adrenorezeptor-Antagonismus vasospasmolytisch und damit in vivo vasodilatierend wirken.

2.4.1 Versuchsablauf

Der Versuchsaufbau und die Versuchsbedingungen sind in Kap. 4.8 beschrieben.

Vor dem eigentlichen Hauptversuch mit den gewählten Diamidinen und Diimidazolininen wurde jeweils eine Kontrollkurve mit Noradrenalin aufgenommen.

Folgende Noradrenalin-Konzentrationen wurden verwendet:

10^{-8} , 5×10^{-8} , 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} [m].

Noradrenalin führte dabei mit steigender Konzentration im Organbad über eine α -Rezeptorenerregung zu zunehmender Kontraktion des Gefäßstreifens, wobei die maximale Kontraktion für die Auswertung als 100% gewertet wurde.

Die erhaltenen Kontraktionswerte wurden gegen die eingesetzte Dosis aufgetragen.

Der Hauptversuch wurde in gleicher Weise durchgeführt, nur wurden alle zu testenden Substanzen 5 Minuten vor Zugabe der ersten Noradrenalinosis dem Bad zugesetzt und zwar in folgenden Konzentrationen:

10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} [m] ¹⁾.

2.4.2 Ergebnisse

Anhand des Modells konnte für alle untersuchten Substanzen eine Hemmwirkung gegenüber Noradrenalin festgestellt werden.

- 1) Legt man bei einer 300 g schweren Ratte ein Blutvolumen von 18 ml zugrunde, würde bei einer Injektion von $10 \mu\text{Mol/kg KG}$ Testsubstanz kurz nach der Applikation die Konzentration im Gesamtblut ca. $1,6 \times 10^{-4}$ [m] betragen, also deutlich über den Werten liegen, die in diesem Test eingesetzt wurden.

Alle Versuchssubstanzen führten zu einer parallelen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve gegenüber einer durch Noradrenalin ohne Hemmstoff erstellten Kontroll-Kurve, was auf einen kompetitiven Antagonismus an α -Rezeptoren des Gefäßes hinweist.

Für 102/198, 192/188 und Pentamidin sind die Ergebnisse in Abb. 2.32 bis 2.34 dargestellt.

102/198 und Pentamidin waren von den getesteten Diamidinen die stärksten Hemmstoffe. Bei Vorbehandlung mit einer Konzentration von jeweils 10 μMol 102/198, Pentamidin und 192/188 konnten folgende ED_{50} -Werte ¹⁾ für Noradrenalin ermittelt werden:

102/198	10 μMol	ED_{50} NA	:	1,7 μMol
Pentamidin	10 μMol	ED_{50} NA	:	0,7 μMol
192/188	10 μMol	ED_{50} NA	:	0,5 μMol

d. h., um nach Vorbehandlung mit 10 μMol 102/198 eine 50%-ige Kontraktion zu erreichen, müssen 1,7 μMol NA, mit 192/188 nur 0,5 μMol NA, eingesetzt werden.

Dieses Ergebnis entspricht in der Reihenfolge in etwa den gefundenen pA_2 -Werten (s.d.).

Schwache Antagonisten waren 313/40 und 261/115.

¹⁾ ED_{50} (Effektivdosis 50) ist die Dosis, bei der die Hälfte (50%) des Maximaleffektes erreicht wird. Im vorliegenden Fall entspricht dies der Dosis an Noradrenalin, die bei vorgegebener gleicher Hemmstoffkonzentration eine 50%-ige Kontraktion hervorruft.

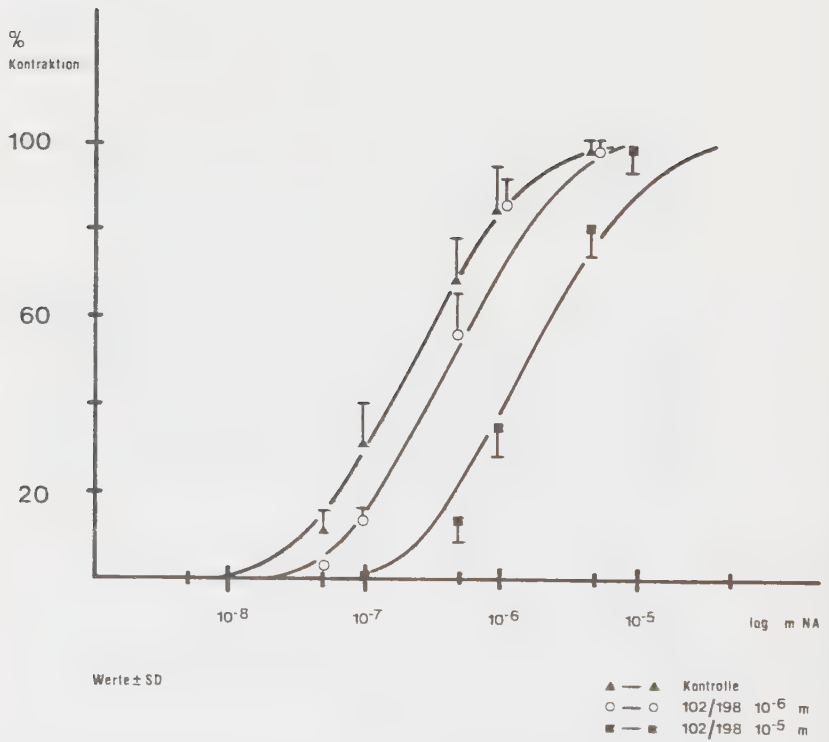


Abb. 2.32 Einfluß von 102/198 auf die Wirkung von Noradrenalin an der isolierten Meerschweinenaorta; dargestellt sind die Mittelwerte aus 4-7 Versuchen

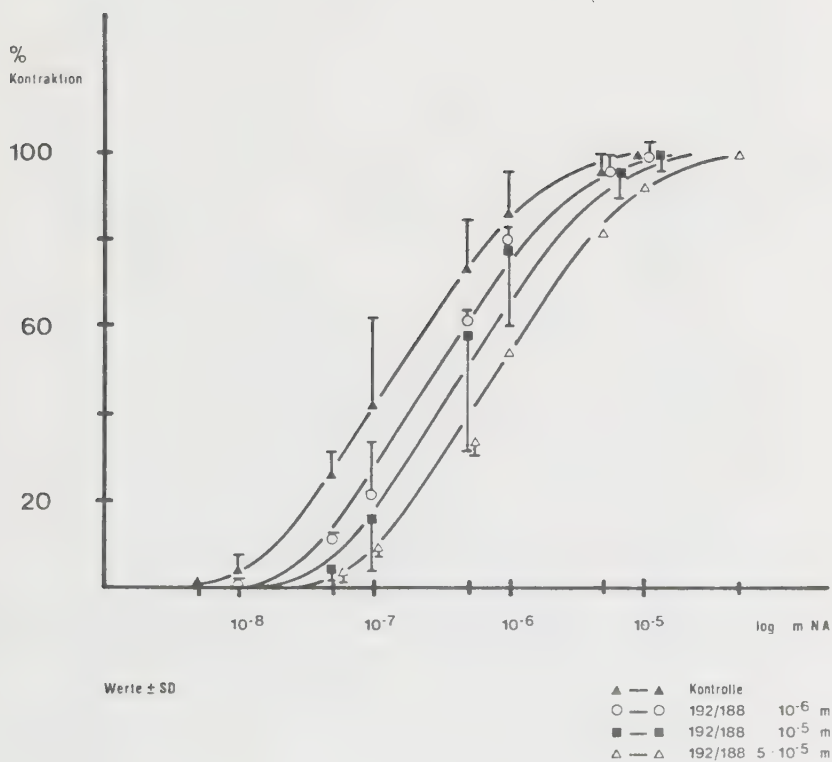


Abb. 2.33 Einfluß von 192/188 auf die Wirkung von Noradrenalin an der isolierten Meerschweinenaorta; dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-4 Versuchen

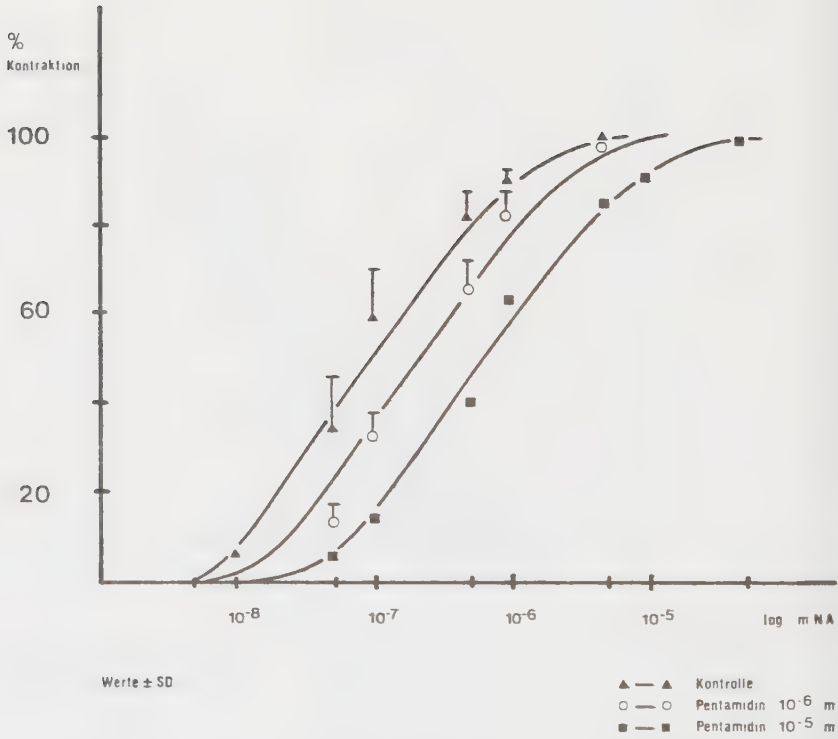


Abb. 2.34 Einfluß von PENTAMIDIN auf die Wirkung von Noradrenalin an der isolierten Meerschweinenaorta; dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-4 Versuchen

2.4.2.1 pA₂-Werte

Als Maß für die Affinität eines kompetitiven Antagonismus gilt der pA₂-Wert (6). Je größer dieser Wert ist, desto höhere antagonistische Potenz besitzt der entsprechende Wirkstoff.

Für die untersuchten Substanzen wurden die pA₂-Werte nach v a n R o s s u m (226) bestimmt.

Für die Substanzen 192/188 und Pentamidin wurde zur Überprüfung der Genauigkeit der pA₂-Wert-Bestimmung nach van Rossum zusätzlich eine Regressionsgerade nach S c h i l d (6) berechnet und mit den Ergebnissen der Bestimmung nach van Rossum verglichen (s. Kap. Statistik).

Um die Validität des Modells zu überprüfen, wurde außerdem der pA₂-Wert von PRAZOSIN ¹⁾ bestimmt und mit Literaturwerten verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2.35 aufgezeigt.

Pentamidin besitzt demnach von den untersuchten Verbindungen die höchste Affinität zu α-Rezeptoren, gefolgt von 102/198 und 150/129.

Bei den Diimidazoliny-Verbindungen konnten keine so hohen pA₂-Werte gefunden werden. Das dem DAPI ähnliche 192/188 hat ersterem gegenüber eine geringere Affinität zu α-Rezeptoren.

1) Prazosin wurde uns für die Versuche von der Firma Pfizer dankenswerterweise kostenlos zur Verfügung gestellt.

Substanz	pA_2 $\pm$ SD	pA_2 -Berechnung nach Schild; r^2 ; Regr. Gerade	Anzahl der Versuche
Pentamidin	$6,12 \pm 0,16$	$6,04$ $r^2 = 0,998$ $y = -0,89x$ $+5,37$	8
102/198	$6,00 \pm 0,27$		15
150/129	$5,61 \pm 0,28$		4
Diminacen	$4,94 \pm 0,19$		6
261/115	$4,51 \pm 0,13$		6
313/40	$4,43 \pm 0,19$		5
297/150	$5,34 \pm 0,35$		5
192/188	$5,27 \pm 0,30$	$5,30$ $r^2 = 0,999$ $y = -0,65x$ $+3,44$	10
253/156	$5,10 \pm 0,26$		5
261/116	$4,90 \pm 0,22$		4
Prazosin ¹⁾	$8,69 \pm 0,05$		2

Tab. 2.35

¹⁾ ref. (212) : $8,13 - 8,38$

2.5 Diskussion der aus den Blutdruckuntersuchungen und den Versuchen an der isolierten Aortenspi- rale gewonnenen Ergebnisse

In der Zusammenschau der Ergebnisse aus den Blutdruck- und den Kontraktionsversuchen an der isolierten Aortenspirale kann man für die Diamidino-Verbindungen folgendes feststellen:

Substanzen, die sich bei den in vitro-Versuchen an der Aorta als relativ starke Noradrenalin-Antagonisten am α -Rezeptor zeigten, führten in der Regel auch zu stärkeren Blutdrucksenkungen bei den Messungen in vivo (102/198, Pentamidin, 150/129).

Man kann also eine gute Korrelation zwischen α -antagonistischer Potenz einerseits und Blutdrucksenkung andererseits bilden, d. h. die Wirkung könnte vorwiegend über α -Rezeptoren vermittelte Vasodilatation zustande kommen, was letztlich zu einer Senkung des peripheren Widerstandes führt.

Etwas weniger eindeutig verknüpfbar waren die Ergebnisse, die mit den Diimidazolinyl-Verbindungen erhalten wurden. Hier konnte nur für 192/188 eine gute Korrelation zwischen pA_2 -Wert und der Blutdrucksenkung erstellt werden.

Unter Umständen wäre es daher sinnvoll, diese Verbindungen auf andere Mechanismen, z. B. auf das Verteilungsverhalten in vivo zu untersuchen.

Ungeklärt bleibt auch weiterhin die Verminderung der Herzleistung für beide Substanzgruppen, die im α -antagonistischen Effekt keine Erklärung findet.

Für die Diimidazolinyl-Verbindungen wäre durch ihre Fähigkeit, die Acetylcholinesterase zu hemmen, eine Einflußnahme auf die Herzleistung über den N. vagus denkbar. Diamidino-Verbindungen haben diese Wirkungskomponente im intakten Organismus jedoch nicht, so daß die-

ser Mechanismus als Ursache fraglich ist. Deshalb sollte nun versucht werden, mittels geeigneter Modelle den Wirkungsmechanismus der Diamidine auf zellulärer Ebene aufzuklären, um dadurch Rückschlüsse auf die Herzwirkung der Substanzen ziehen zu können.

2.6 Weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Diamidine

Hierzu wurden folgende Modelle herangezogen:

- a) histologischer Nachweis der Diamidine im Gewebe
- b) Elektrokardiogramm
- c) Mitochondrienfunktion
- d) Enzymaktivitätsmessung

2.6.1 Histologische Befunde

2.6.1.1 Nachweis von 102/198 und 192/188 durch V o i g t - F ä r b u n g in der Leber, Niere, Gefäßwand und im Herzen der Ratte

Mittels der Färbung nach Voigt (s. Kap. 4.12) lassen sich Ablagerungen von 102/198 (DAPI) in gelbkristalliner Form nachweisen und bei der hellblauen Grundfärbung der Gewebe gut erkennen.

102/198-behandelte Tiere zeigen eine diffuse Anreicherung der Substanz ohne Hinweis auf eine bevorzugte Ablagerung in bestimmten Gewebestrukturen. So ließen sich in der Leber, in der Niere und im Herzen disseminierte, kristalline Ausfällungen beobachten, die keine bestimmte Struktur, wie etwa Gallenkanälchen, Glomerula oder Tubuli, bevorzugten. Anders verhielt es sich in der Aortenwandung. Die Hauptmasse der DAPI-Ablagerungen fanden sich entlang der muskulären Wandungsteile, während die elastischen und kollagenen Fasern weitgehend frei waren (Abb. 2.36). Die Ablagerungen entlang der Muskelfasern der Gefäßwandungen entsprechen anatomisch dem Verlauf der Sarkolemmschläuche, und in manchen anderen Arealen fand sich eine quer zur Muskelfaser verlaufende, verstärkte Ablagerung, die den hier die Muskelbündel kreuzenden Sarkolemmschläuchen entsprechen kann.

Im Gegensatz zu den bindegewebigen Anteilen der Gefäßwand befinden sich in diesem Bereich verstärkt elektronegative Strukturen, wie Myoproteine und P h o s p h o l i p i d e, was erklären würde, weshalb die Ablagerung der kationischen Verbindungen gerade hier erfolgt.

Eine toxische Beeinträchtigung struktureller oder funktioneller Proteine der Myofilamente oder der Sarkolemm-Membran könnte dadurch möglich sein.



Abb. 2.36 Rattenaorta (400 x, Voigt-Färbung)
elastische Fasern (1), muskuläre Anteile (x),
deutliche Ablagerungen gelb-leuchtender Ausfällungen
von 102/198 entlang der Grenzlamelle zwischen kon-
traktilen und elastischen Elementen der Aortenwan-
dung (2);
quer zum muskulären Anteil verlaufende Ausfällungen (3)

2.6.2 EKG-Untersuchungen an der Ratte

Gemäß den Ergebnissen, die bei den Messungen der Herzpumpleistung (Carotisdurchflußvolumen/Minute) erhalten wurden, ist ein Teil des peripheren Blutdruckabfalls auf eine verminderte Kontraktionskraft des Herzens zurückzuführen. Dieser Effekt sollte sich in Veränderungen des elektrophysiologischen Verhaltens des Herzens widerspiegeln.

2.6.2.1 Allgemeine Angaben zum Ratten-EKG

Das Elektrokardiogramm der Ratte entspricht weitgehend dem des Menschen (30,194).

Unterschiedlich sind die Herzfrequenz und die unmittelbar aus dem Kammerkomplex entstehende T-Wellen mit fehlender ST-Strecke (109,137) (Abb. 2.37).



Abb. 2.37

2.6.2.2 Methode

Alle Versuche wurden an narkotisierten (Urethan 1,3 g/kg KG i. p.), männlichen oder weiblichen Ratten von 250-350 g Körpergewicht in Rückenlage durchgeführt. Das EKG wurde mittels Einstechelektroden und Extremitätenableitung (Einthoven I) abgenommen, d. h. bipolar mit einer Erdungselektrode am linken Hinterlauf.

Als Registriergerät diente ein Watanabe, Mark V Schnellschreiber mit EKG-Koppler.

Die Schreibgeschwindigkeit betrug 25, 50 und 100 mm/s. Das Eichsignal entsprach 1 mV/5cm.

Die Diamidine wurden über einen Femoralis-Katheter i. v. verabreicht.

Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden, gewichtsbezogen auf Base, verwendet:

102/198	:	20; 50	μMol/kg KG
192/188	:	20; 50	μMol/kg KG
Pentamidin	:	20; 50	μMol/kg KG
313/40	:	50	μMol/kg KG
43387	:	5; 7,5	μMol/kg KG

2.6.2.3 Ergebnisse

Alle verwendeten Substanzen [102/198, Pentamidin, 192/188, 43387 (Hoechst) und 313/40] führten dosisabhängig zu den gleichen Veränderungen im EKG.

Alle gemeinsamen Zeichen bei einer Dosierung von 20 μMol/kg KG Diamidin waren:

1. Tachycardie
2. R-Verlust
3. gelegentliches Auftreten einer deutlichen Q-Zacke
4. verbreitertes, abgesenktes S und Depression des angrenzenden ST-Bereiches
5. Verschwinden der T-Welle bis hin zu Inversion.

Höhere Dosen führten von Substanz zu Substanz zu unterschiedlich starken Veränderungen des EKG's:

Von 102/198 (Abb. 2.38) waren 50 μMol/kg KG, im Vergleich zu anderen Substanzen, noch relativ gut verträglich. Initial war bereits 10 Sekunden p. i. eine Verkleinerung der P-Wellen-Breite (Vorhof) mit abgesenktem S und descendierendem ST (bzw. negativem T) feststell-

bar. Im Laufe einer Minute kam es zu einem deutlichen R-Verlust, der ebenso wie die T-Inversion noch nach einer Stunde eindeutig vorhanden war.

P e n t a m i d i n war bei einer Dosierung von 50 mg/kg KG, wie es schien, deutlich toxischer (Abb. 2.39). 30 Sekunden p. i. war bereits ein R-Verlust erkennbar, mit tiefer und breiter S-Zacke (rS).

Nach 2 Minuten war praktisch nur noch eine kleine R-Zacke vorhanden, was auf schwere Störungen der Erregungsausbreitung infolge einer Hypoxie innerhalb der Kammer hindeutete. Nach 13 Minuten trat eine dramatische Verschlechterung des Gesamtbildes ein, mit deutlicher, spitzer Vorhofzacke und verbreitertem S bzw. ST. Nach 15 Minuten kam es zum Atemstillstand mit verbleibender Herzautonomie und deutlich verringerter Frequenz.

1 9 2 / 1 8 8 führte nach Gabe von 50 μ Mol/kg KG in wenigen Minuten zum Tode der Versuchstiere durch Herzstillstand. Abb. 2.40 zeigt das Bild einer akuten Hypoxie. 10 Sekunden p. i. kam es zu einer muldenförmigen ST-Senkung, nach 30 Sekunden war, neben einer ST-Hebung, ein spitzshohes T ("Erstickungs-T") zu sehen. 2 Minuten p. i. entstand das EKG-Bild eines P-pulmonale, mit deutlichen Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz und einer tiefen, breiten S-Zacke. Danach kam es zum Exitus durch Herzstillstand.

Abb. 2.41 zeigt ein ähnliches Bild. Hier kam es nach 25 Sekunden zu schwersten Rhythmusstörungen (Kammerflattern), nach 30 Sekunden traten ST-Hebungen und das Bild eines AV-Blockes mit Kammerautomatie auf. 2 Minuten p. i. Exitus.

Die Substanzen 43387 und 313/40 führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen:

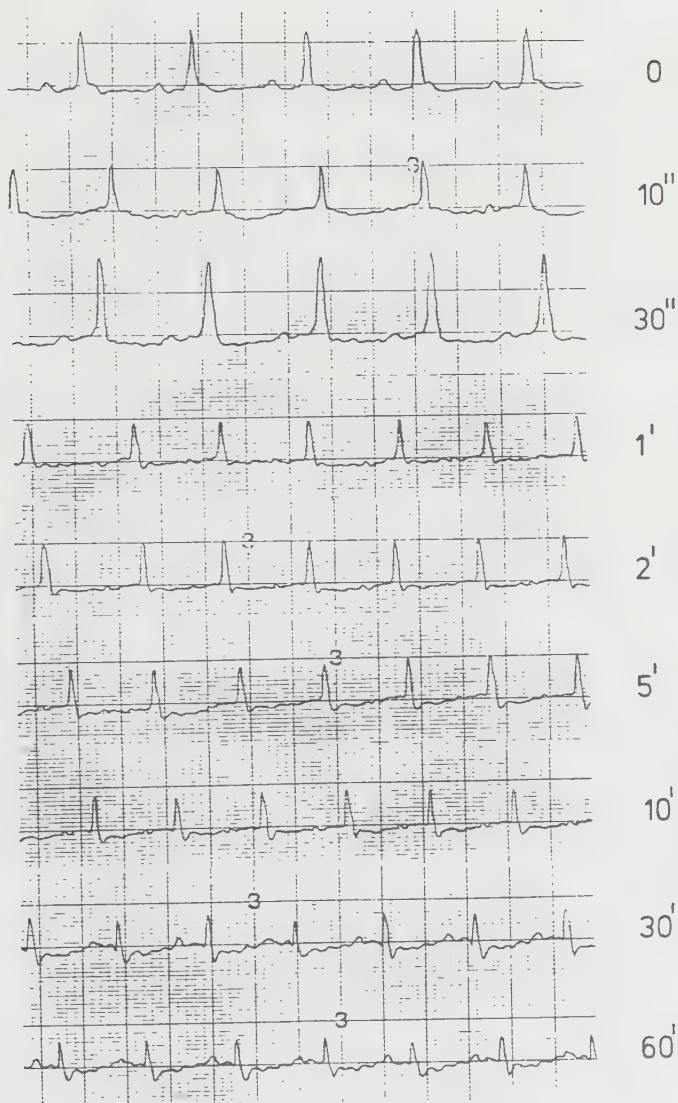


Abb. 2.38 Ratten-EKG, Ableitung: Einthoven I,
102/198, 50 μ Mol/kg KG i. v.,
0 = vor Injektion

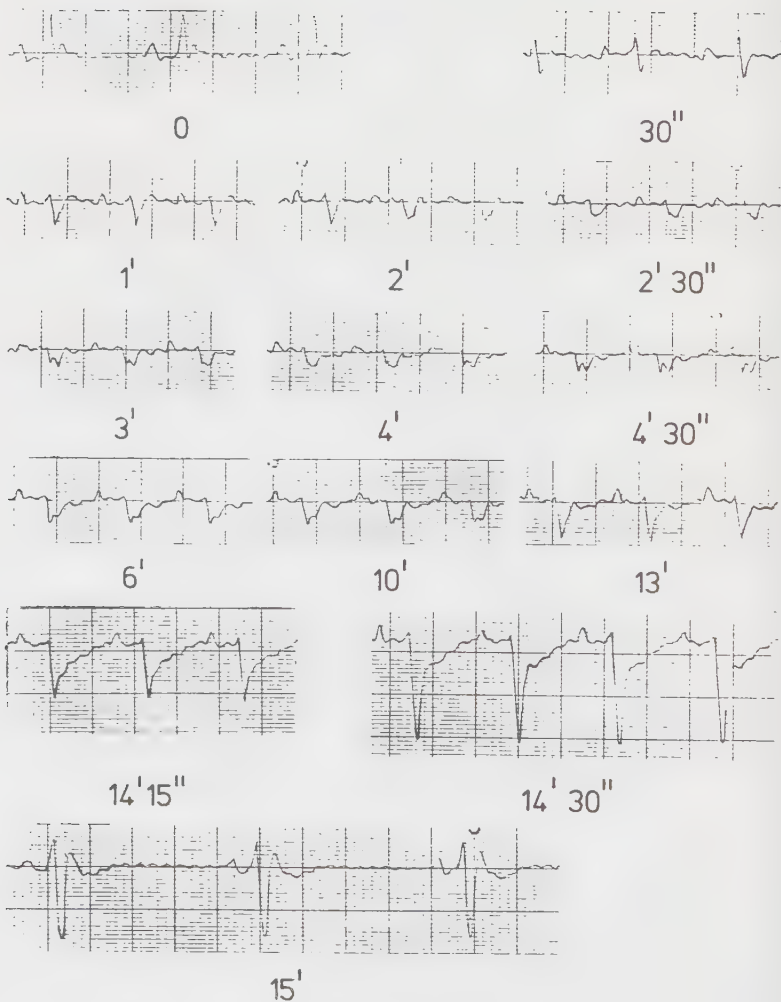


Abb. 2.39 Ratten-EKG, Ableitung: Einthoven I,
PENTAMIDIN, 50 μ Mol/kg KG i. v.,
0 = vor Injektion

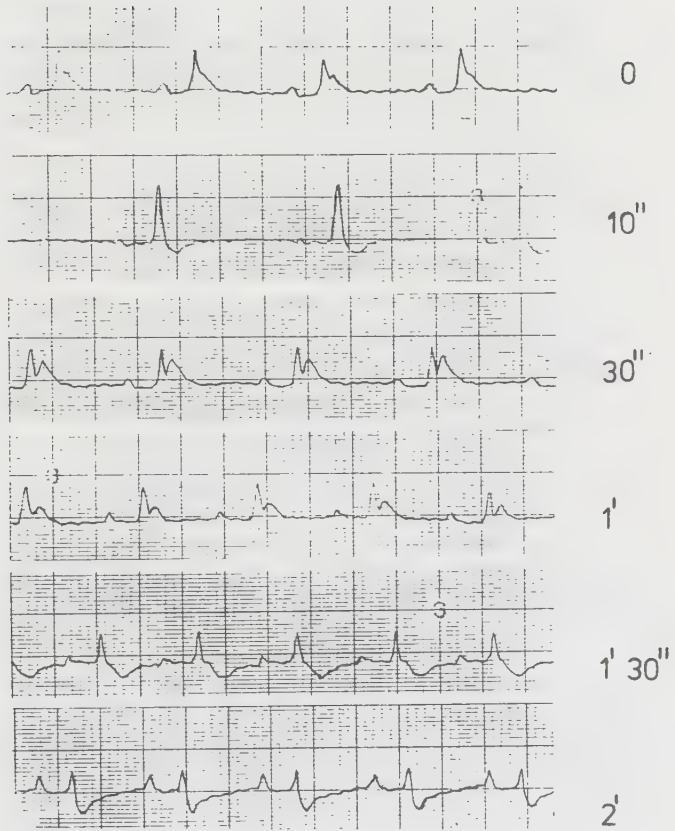


Abb. 2.40 Ratten-EKG, Ableitung: Einthoven I,
192/188, 50 $\mu\text{Mol/kg}$ KG i. v.,
0 = vor Injektion

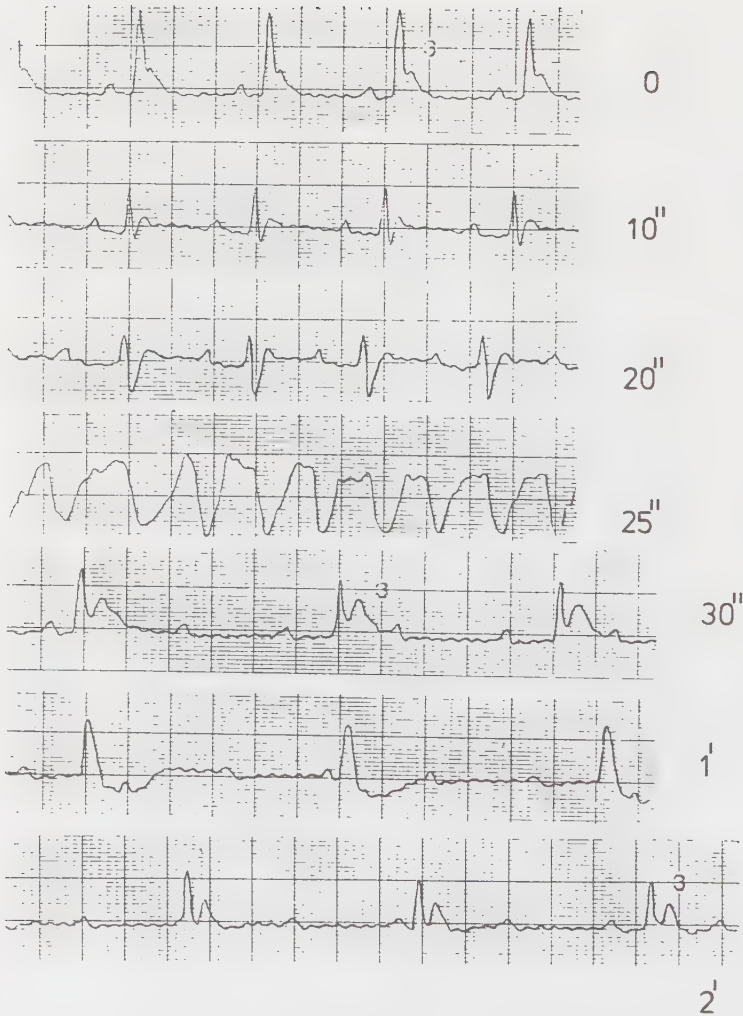


Abb. 2.41 Ratten-EKG, Ableitung: Einthoven I,
192/188, 50 μ Mol/kg KG i.v.,
0 = vor Injektion

3 1 3 / 4 0 war die unter den getesteten Substanzen am wenigsten cardiotoxische. Zwar konnte auch hier eine S-ST-Senkung registriert werden, doch führte diese Verbindung in einer Dosierung von 50 $\mu\text{Mol/kg}$ KG eher zu einer R-Erhöhung und zu keinerlei Arrhythmien.

4 3 3 8 7 war die am schlechtesten verträgliche Substanz. Bereits eine Gabe von 5 $\mu\text{Mol/kg}$ KG führte bei 2 Tieren innerhalb von 30 Minuten zum Tode, 7,5 $\mu\text{Mol/kg}$ KG bei 1 Tier innerhalb von 15 Minuten. Auch hier waren deutliche R-Reduktion, breite S-Zacke und T-Inversion erkennbar. Nach 15-30 Minuten führte die Substanz, offensichtlich auf Grund ihrer cardio-depressiven Wirkung, zu massivem Lungenödem, was wahrscheinlich die Ursache des Todes war.

2.6.2.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man auf Grund der EKG-Ergebnisse die Wirkung der trypanociden Diamidine wie folgt charakterisieren:

1. Die beobachteten Veränderungen im elektrophysiologischen Verhalten des Herzens können als Zeichen einer akuten Herzhypoxie gedeutet werden.
2. Es besteht eine Dosisabhängigkeit bei den qualitativen und quantitativen Veränderungen im EKG.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden von S c h m i d t (201) an Affen und Hunden, die an der Leber Veränderungen in Form einer Blutstauung zeigten, einem offensichtlichen Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz.

Für DIMINACEN konnte R u e b u s h (180) bei der Behandlung von Babesieninfektionen am Menschen über ST-T-Wellen-Veränderungen berichten.

B i e r m a n (24,25) untersuchte EKG-Veränderungen nach STILBAMIDIN-Gabe bei Patienten mit multiplen Myelomen und an Mäusen.

Übereinstimmend wurden bei den Patienten ST-Senkungen, T-Wellen-Abflachungen, Sinus-Tachycardie, Blutdruckabfall und Abfall der arteriellen Sauerstoffsättigung festgestellt.

Bei Mäusen wurden dosisabhängig folgende Zeichen registriert:

- Verschiebung des Sinusrhythmus zum AV-Rhythmus hin mit Abfall der Herzfrequenzen,
- progressiver SA- und AV-Block,
- T-Wellen-Veränderungen

Alle beschriebenen und in den Versuchen erhaltenen Veränderungen im EKG können mit den von K a d u k (125) im Elektronenmikroskop festgestellten Schäden am Herzmuskel und den Mitochondrien in Einklang gebracht werden. Diese Schäden umfaßten am Herzmuskel Rupturen von Myofibrillen und interfilamentäre Ödeme, die Mitochondrien waren geschwollen und die Cristae teilweise reduziert.

Die Kenntnis dieser Fakten warf die Frage auf, worauf sich die hypoxischen Erscheinungen zurückführen lassen. Prinzipiell ist eine Sauerstoffminderversorgung des Herzens über verschiedene Wege möglich, z. B.

- a) verminderte Erythrozytenanzahl
- b) verminderter Sauerstoffpartialdruck in der Lunge mit geringerer Blutsauerstoffsättigung
- c) Atemwegsobstruktionen
- d) verminderter Coronarfluß
- e) Herzinsuffizienz.

Für keinen dieser Faktoren lag ein Anzeichen vor, so daß ein direktes Eingreifen der Amidine in den E n e r - g i e s t o f f w e c h s e l wahrscheinlich erschien.

Deshalb wurden nun mögliche Interaktionen der Diamidine bei der Energiebereitstellung untersucht.

2.6.3. Interaktionen mit anionischen Strukturen

Die spezifische chemische Struktur der trypanociden, bis-kationischen Verbindungen ist gleichzeitig ausschlaggebend für ihre Fähigkeit, mit anionischen Strukturen ionale Bindungen einzugehen.

Erwähnt wurden schon Verbindungen mit Nukleoproteiden, DNA, Heparin u. a.

Von größerer Bedeutung scheint die Bindung an P h o s - p h o l i p i d e (108,118,146,147,242,243) zu sein.

Interaktionen mit Phospholipiden werden für Veränderungen im Metabolismus von Energieträgern, für Veränderungen von Membranfunktionen und der Polynukleotidsynthese verantwortlich gemacht (146,147,243).

Diese Erkenntnisse und eigene Erfahrungen mit schwer löslichen Phosphaten von 102/198 und 192/188 führten zu Untersuchungen über Bindungen dieser Substanzen an e n e r g i e r e i c h e P h o s p h a t e.

2.6.3.1 Fällungsreaktion bis-kationischer Diamidine mit energiereichen Phosphaten

2.6.3.1.1 Methode

Für die Prüfung der Bildung schwer löslicher Verbindungen mit 102/198 und 192/188 wurden von ATP, ADP und AMP jeweils 10 m molare Stammlösungen hergestellt [physiol. ATP Konzentration = 5 m molar, (136)].

DAPI und DIPI wurden in Verdünnungsreihen von 2 m molar bis 20 μ molar gelöst und mit den Stammlösungen von ATP, ADP und AMP im Verhältnis 1:1 in Polystyrolröhrchen gemischt.

Die Mischungen wurden 24 Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend im UV-Licht bei 366 nm auf Ausfällung untersucht. Creatinphosphat (CP) wurde im Verhältnis 3 m molar / 3 m molar mit den Diamidinen gemischt.

2.6.3.1.2 Ergebnisse

Bei den hohen Konzentrationen bildeten die Diamidine nahezu augenblicklich schwer lösliche Niederschläge (s. Tab. 2.42 und 2.43).

Sowohl für 102/198 als auch für 192/188 gilt die Tatsache, daß AMP eine viel geringere Tendenz zur Bildung schwer löslicher Niederschläge hat als ATP; ADP liegt in etwa dazwischen. Hier ist offensichtlich die Anzahl der ionisierten Phosphatgruppen für den Grad der Ausfällung ausschlaggebend.

Creatinphosphat ergab keinen Niederschlag.

Bei diesen Versuchen fiel auf, daß eine Veränderung der Fluoreszenzintensität bei niedrigen Diamidindosen auftrat. Dieses Phänomen ist bereits von Verbindungen der trypanociden Diamidine mit DNA bekannt (26,72,127, 128,139).

Deshalb wurde das Fluoreszenzverhalten von 102/198 und 192/188 in Abwesenheit und in Gegenwart von ATP näher untersucht. Die Diamidinkonzentration wurde so gewählt, daß keine Fällungen auftraten.

Substanz kationisch	Konz. [μmol]	Substanz anionisch	Konz. [mmol]	Fällung xxx = stark xx = mäßig x = wenig (x) = nach- weisbar	Art des Nieder- schlags
102 / 198	1000	ATP	5	xxx	kristallin
	500	ATP	5	xx	
	100	ATP	5	x	
	50	ATP	5	(x)	
	10	ATP	5	(x)	
	1000	ADP	5	xx	kristallin
	500	ADP	5	x	
	100	ADP	5	o	
	1000	AMP	5	xx	flockig
	500	AMP	5	(x)	
	100	AMP	5	o	
	1000	CP	3	o	

x = Fällung; o = keine Fällung

Tab. 2.42 Bildung schwer löslicher Niederschläge von 102/198 mit energiereichen Phosphaten

Substanz kationisch	Konz. [μmol]	Substanz anionisch	Konz. [mmol]	Fällung	xxx = stark xx = mäßig x = wenig (x) = nach- weisbar	Art des Nieder- schlags
192 / 188	1000	ATP	5	xxx		kristallin
	500	ATP	5	xx		
	100	ATP	5	x		
	50	ATP	5	(x)		
	10	ATP	5	o		
	1000	ADP	5	xx		kristallin bis flockig
	500	ADP	5	x		
	100	ADP	5	o		
	1000	AMP	5	xx		flockig
	500	AMP	5	x		
	100	AMP	5	o		
	1000	CP	3	o		

x = Fällung; o = keine Fällung

Tab. 2.43 Bildung schwer löslicher Niederschläge von 192/188 mit energiereichen Phosphaten

2.6.3.2 Fluoreszenzverhalten

2.6.3.2.1 Methode

Für die Messungen wurden die Diamidine in Aqua bidest gelöst. Zunächst wurden jeweils Absorptions- und Emissionsspektren ohne ATP-Zusatz aufgenommen, für 102/198 zusätzlich noch mit unterschiedlichen pH-Werten der Lösung.

Wegen der starken Fluoreszenzzunahme wurde für den Hauptversuch mit 5 mmol ATP, 102/198 10-fach, 192/188 2-fach verdünnt.

Die Spektren wurden in Quarzküvetten aufgenommen, das Volumen betrug 3 ml.

Fluorometer: Kontron SFM 23, Medium, 10,0

Schreiber: Linseis Flatschreiber, 500 mV, 50 mm/min.

2.6.3.2.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche zeigen Tab. 2.44 und Abb. 2.45 bis 2.46.

A T P hat ein Anregungsmaximum bei 298 nm und zwei Emissionsmaxima bei 368 und 392 nm.

1 0 2 / 1 9 8 hat ohne ATP ein Absorptionsmaximum bei 354 nm, ein Emissionsmaximum bei 482 nm. Nach Zugabe von 5 mmol ATP kommt es

- a) zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (>10-fach),
- b) zur Verschiebung des Anregungsmaximums um 8 nm zu längeren Wellenlängen hin (bathochromer shift),
- c) zur Verschiebung des Emissionsmaximums um 6 nm zu kürzeren Wellenlängen hin.

Der p H - W e r t spielt bei der Verschiebung keine Rolle, jedoch wird die Intensität der Fluoreszenz mit steigendem pH geringer.

Substanz	Konzentration μ mol	Anregung nm	Emission nm
102/198	10	354	482
102/198 + ATP	1 5000	362	476
192/188	1	358	474
192/188 + ATP	0,5 5000	366	472
ATP	10000	298	368/392

Tab. 2.44 Fluoreszenzmaxima: Anregung und Emission
bei 25° C, in H₂O

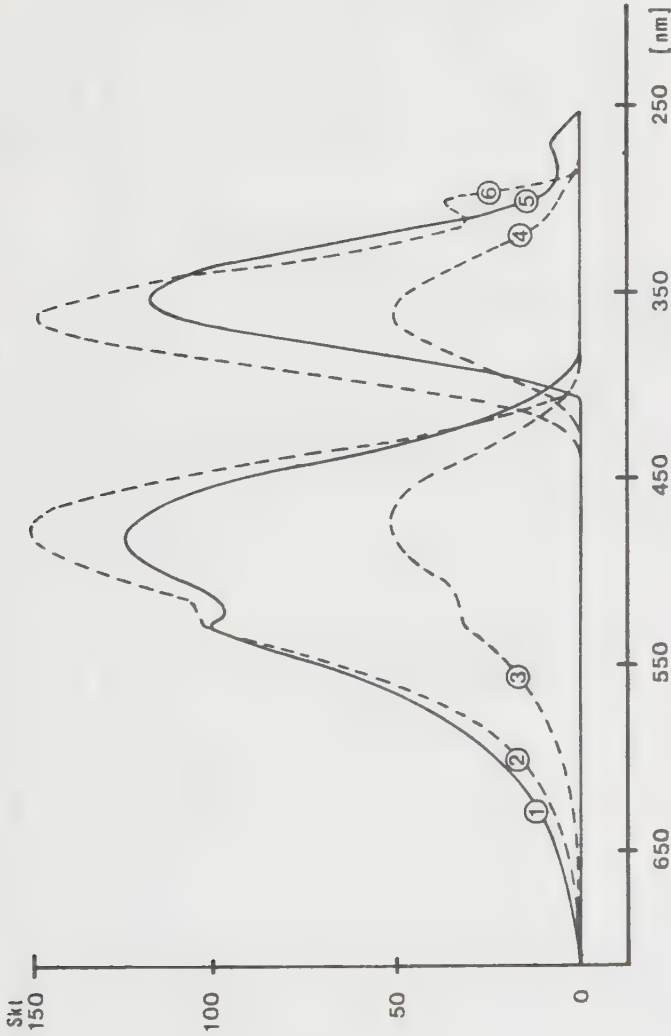


Abb. 2.45 Anregungs- ⑤ und Emissionsmaxima ① von 102/198, 10 μ mol, in H_2O ;
 Anregungs- ⑥ und Emissionsmaxima ② von 102/198, 1 μ mol, in Gegenwart von
 5 m mol ATP, pH 2,7, in H_2O ;
 Anregungs- ④ und Emissionsmaxima ③ von 102/198, 1 μ mol, in Gegenwart von
 5 m mol ATP, pH 6,6, in H_2O

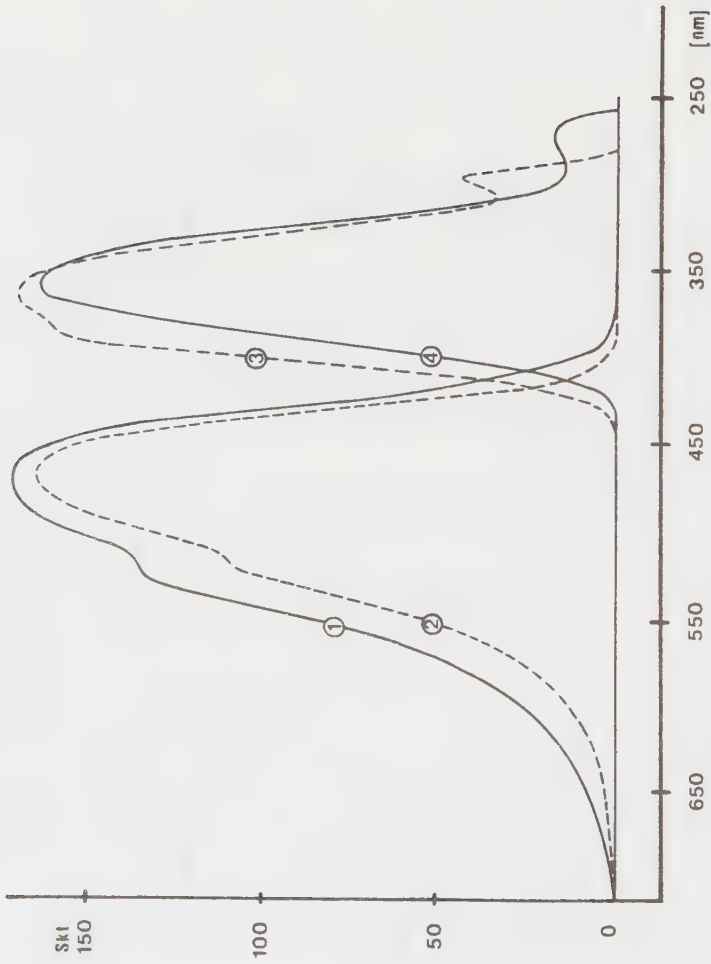


Abb. 2.46 Anregungs- (4) und Emissionsmaxima (1) von 192/198, 1 μ mol, in H_2O ;
Anregungs- (3) und Emissionsmaxima (2) von 192/188, 0,5 μ mol, in Gegen-
wart von 5 m mol ATP, in H_2O

1 9 2 / 1 8 8 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 472 nm. In Analogie zu 102/198 kommt es nach Zugabe von 5 m mol ATP zur 0,5 μ molaren Lösung zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität und zu einem bathochromen shift des Anregungszentrums. Das Emissionsspektrum verschiebt sich nur geringfügig.

Aus diesen Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden:

Durch die Bindung an den Hauptenergieträger ATP können Diamidine über eine mögliche Verarmung an energiereichen Phosphaten in alle jene physiologischen Prozesse eingreifen, die energieabhängig sind.

Zu diesen gehört unter anderem auch der große Energiemengen erfordernde Kontraktionsprozeß an den Herzmuskelzellen. Es könnte also sein, daß die beobachtete Herabsetzung der Herzleistung durch eine verminderte Verfügbarkeit von ATP mit bedingt ist.

2.6.4 Orientierender Versuch zum Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien unter Diamidineinwirkung

Die EKG-Untersuchungen (Kap. 2.6.2) hatten Zeichen einer hypoxischen Schädigung des Herzens erkennen lassen. Beim Menschen beruht eine Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung des Herzens in der Regel auf einer insuffizienten Blutversorgung myocardialer Strukturen und äußert sich dann im Bild einer Angina pectoris, bei progredientem Sauerstoffmangel der Herzmuskulatur letztlich als akuter Herzinfarkt.

Bei unseren Untersuchungen konnte ein Sauerstoffmangel auf Grund einer Minderdurchblutung des Herzens bei der Registrierung der EKG's und der Blutdruckparameter ausgeschlossen werden, so daß als Ursache der Hypoxie eine Beeinflussung der mitochondrialen Atmung in Frage kam.

In diese Richtung deuten auch die Ergebnisse von Arnold, Gerccke (5,92), Schuhmacher (213) und Kaduk (125), sowie die Tatsache, daß Mitochondrienschäden bereits für PENTAMIDIN und 102/198 an Tryp. rhodesiense beschrieben wurden (242). Auch ISOMETAMIDIUM scheint sich in Mitochondrien einzulagern (162).

2.6.4.1 Mitochondrien: Aufbau und Funktion

Die intrazellulär gelegenen Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgeben, deren äußere Schicht glatt und relativ elastisch ist. Die innere Membran enthält Cristae und umschließt den Matrixraum.

Äußere Membran, innere Membran und Matrix sind in ihrer molekularen Zusammensetzung und ihrer Enzymausstattung unterschiedlich.

Die innere Membran enthält Cytochrome b, c, c₁, a und a₃, die für die oxidative Phosphorylierung not-

wendige F_1 -ATPase und verschiedene Dehydrogenasen (Succinat, NADH). Die ä u ß e r e Membran enthält keines dieser Enzyme. Eingelagert sind hier die Monoaminoxidase, Phospholipase A_2 und andere.

Der R a u m z w i s c h e n d e n M e m b r a n e n enthält die wichtige Adenylat-Kinase (Myokinase), die die Reaktion



katalysiert.

Als genauer Sitz für die CREATIN-KINASE konnte die äußere Oberfläche der inneren Membran festgestellt werden. Die M a t r i x enthält die Enzyme des Citratcyclus.

In den Zellen tierischer Körper kommt den Mitochondrien die Aufgabe zu, die energiereichen Phosphate als Energieträger für Synthesereaktionen, Transport- und Kontraktionsvorgänge zu bilden.

Der Transport von Energie zwischen Mitochondrien und den energieakzeptierenden Stellen erfolgt in Form von ATP. ATP entsteht in den Mitochondrien aus ADP unter Mithilfe von NADH und $FADH_2$ mittels oxidativer Phosphorylierung.

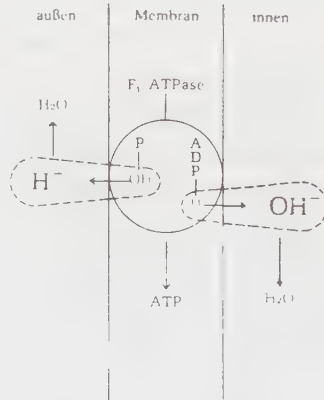
Der Mechanismus der Umwandlung von Redoxenergie des Elektronen- oder Wasserstofftransportes in chemisch gebundene Energie wird heute mit der chemiosmotischen Theorie von M i c h e l l erklärt.

Nach dieser Vorstellung werden energieliefernde und energieverbrauchende Reaktionen durch einen quer zur Mitochondrienmembran gelagerten Protonengradienten gekoppelt. Beim Elektronentransport in der Atmungskette wird dieser Gradient durch eine besondere Anordnung der Atmungskette aufgebaut, bei der protonenverbrauchende Reaktionen auf der Innenseite der i n n e r e n Membran und protonenproduzierende Reaktionen auf der Außenseite ablaufen. Die ATP-Bildung erfolgt entsprechend aus ADP und Phosphat, man stellt sich dabei eine assymetrische Entfernung von

H^+ nach innen und OH^- nach außen von dem im aktiven Zentrum der ATPase gelegenen ATP-Moleküle vor. Entsprechend der Nachbildung des Protonengradienten erfolgt die ATP-Bildung. Der Protonengradient wird dabei laufend abgebaut, woraus sich ein "steady state" ergibt.

Abb. 2.47

Wirkungsweise der ATP-ase bei der ATP-Synthese mit Hilfe eines quer zur Membran stehenden Protonengradienten (n. Lehninger)



2.6.4.2 Atmungskontrolle der Elektronentransportrate

Der Elektronentransport innerhalb der Mitochondrien läuft nur dann mit maximaler Geschwindigkeit, wenn im umgebenden Medium ADP und anorganisches Phosphat zur Synthese von ATP vorhanden sind. Fehlt ADP, so ist die Atmungsrate gering und es findet keine Phosphorylierung statt. Dieser Zustand wird als Atmungszustand 4 (state 4) bezeichnet. Bei Zugabe einer definierten Menge ADP wird das zugesetzte ADP zu ATP phosphoryliert, wobei der Sauerstoffverbrauch zu einem Maximum ansteigt. Ist ADP vollständig phosphoryliert, geht der Sauerstoffverbrauch auf das Maß im state 4 zurück (s. Abb. 2.48). Als R C R (respiratory control ratio) oder A t e m - k o n t r o l l q u o t i e n t Q wird das Verhältnis bezeichnet, das sich zwischen der mitochondrialen Atmungsrate bei ausreichender ADP-Menge und der Atmungsrate in Abwesenheit von ADP einstellt.

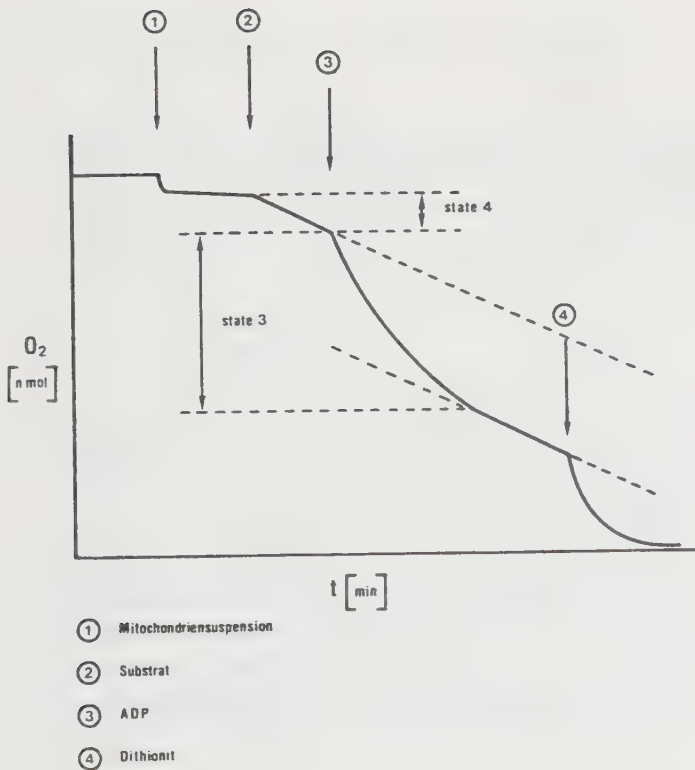


Abb. 2.48 Atmungskontrolle isolierter Mitochondrien, Messung des Sauerstoffverbrauches mit Hilfe der Sauerstoffelektrode

Je größer das Verhältnis von state 3 zu state 4 ist, desto besser ist der Funktionszustand der Mitochondrien. Werden Mitochondrien geschädigt, verlieren sie die Fähigkeit zur ADP-Phosphorylierung, wobei sich der RCR erniedrigt.

Der Atemkontrollquotient Q (RCR) stellt somit ein gutes Maß für die Funktionsfähigkeit von Mitochondrien dar.

2.6.4.3 Entkoppler und Hemmer der oxydativen Phosphorylierung

Die oxydative Phosphorylierung der Mitochondrien kann durch eine Reihe ganz verschiedener Agentien beeinflusst werden:

1. **E n t k o p p e l n d e** Substanzen lassen den Elektronentransport ungestört ablaufen, verhindern aber die Phosphorylierung von ADP zu ATP, entkoppeln also die Bildung von energiereichem Phosphat von den Oxydationsprozessen der Endoxydation.

Substanzen dieser Art stimulieren bei intakten Mitochondrien in Abwesenheit von ADP die Sauerstoffaufnahme.

Standardsubstanz ist das Dinitrophenol (DNP).

2. **I n h i b i t o r e n** der oxydativen Phosphorylierung unterscheiden sich von den Entkopplern durch die Inhibierung des Sauerstoffverbrauches nach ADP-Zusatz. Auch diese Gruppe verhindert die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Oligomycin gehört in diese Gruppe.

Zur Verdeutlichung der einzelnen Effekte der Hemmstoffe und Entkoppler s. Abb. 2.49.

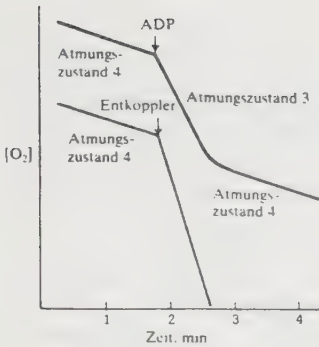
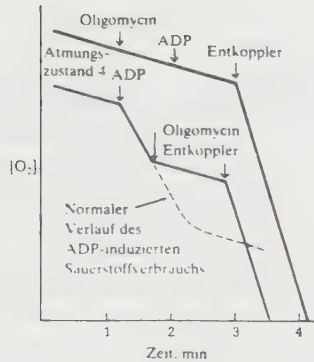


Abb. 2.49 (nach Lehninger)

Wirkungsweise von entkoppelnden Agentien. Zugabe von ADP zu atmen-den Mitochondrien verursacht einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches. 2,4-Dinitrophenol (Entkoppler) bewirkt eine unbegrenzte Stimulation der Atmung.



Wirkungsweise von Oligomycin. Oligomycin inhibiert nicht den state 4, sondern verhindert die Stimulation durch ADP. Entkoppler können auch in Anwesenheit von Oligomycin den Sauerstoffverbrauch stimulieren.

2.6.4.4 Mitochondrien

Für die Versuche zur Mitochondrienatmung wurden Ratten-lebermitochondrien verwendet.

Männliche oder weibliche Wistar-Ratten, die ein Körper-gewicht von 250-350 g hatten und normal gefüttert und getränkt worden waren, wurden getötet und die Leber schnell entfernt.

6 g der gewonnenen Leber wurden zur Isolierung der Mito-chondrien verwendet.

Eine ausführliche Versuchsbeschreibung erfolgt in Kap. 4.9.

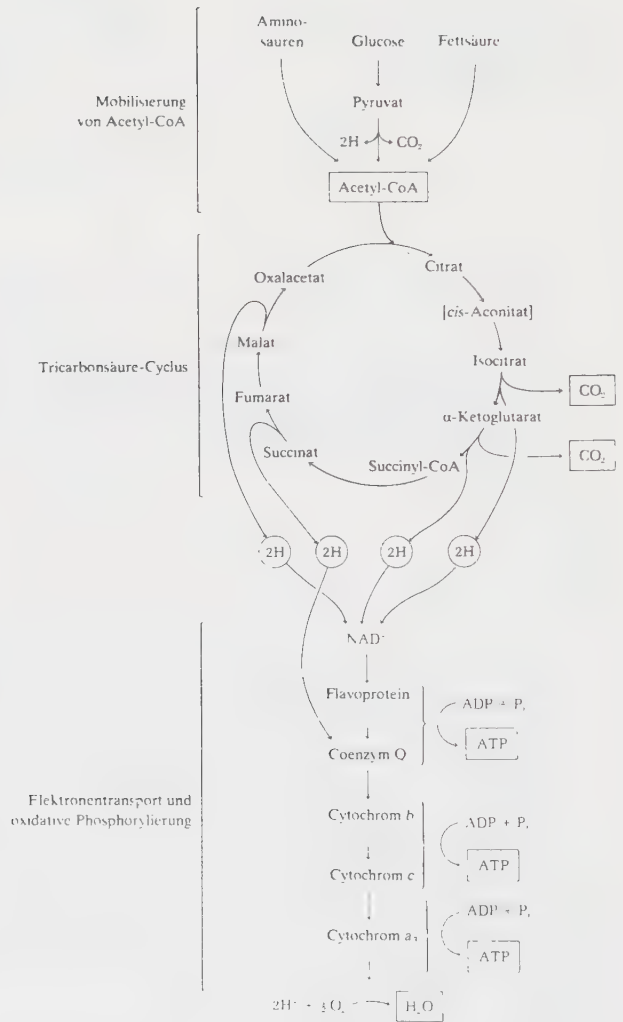
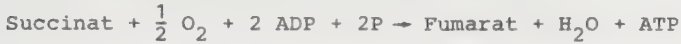


Abb. 2.50 Fließschema der Atmung

2.6.4.5 Substrat

Für die Versuche wurde als Substrat Succinat gewählt.
Die Gesamtgleichung für die Reaktion lautet:



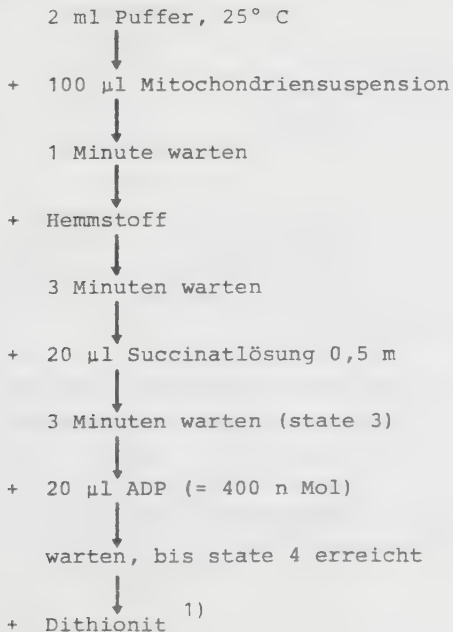
Der bei der Reaktion Succinat $\rightarrow$ Fumarat im Citrat-
cyclus freiwerdende Wasserstoff wird über Coenzym Q
in die oxydative Phosphorylierung eingeschleust
(Abb. 2.50).

2.6.4.6 Messung des Sauerstoffverbrauches von Ratten- leber-Mitochondrien

Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels einer Sauerstoff-
Elektrode vom Typ Clark (Versuchsbeschreibung s. Kap. 4.9.2.2)
der Fa. Bachofer, Reutlingen, gemessen.

Die Reaktionskammer enthielt 2 ml Inkubationspuffer von
25° C.

Folgendes Versuchsschema wurde bei den Untersuchungen
beibehalten:



- 1) Dithionit reduziert den verbleibenden Sauerstoff, so daß damit der untere Eichpunkt (O_2 =Null) bei der Aufzeichnung der Sauerstoffverbrauchskurve geschaffen wird.

Die Diamidine PENTAMIDIN, 102/198 und 192/188 wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

4,6	x	10^{-5}	molar
9,2	x	10^{-5}	molar
1,38	x	10^{-4}	molar
2,28	x	10^{-4}	molar
4,46	x	10^{-4}	molar

2.6.4.7 Ergebnisse

Alle drei getesteten Substanzen wirken auf die Mitochondrienfunktion gleichsinnig ein, jedoch mit dosis-spezifischen Unterschieden.

Alle Verbindungen senken die Sauerstoffverbrauchsrate/Minute im state 3 und steigern sie im state 4.

Der Atmungskontrollquotient Q fällt ab.

Ein Anstieg des Sauerstoffverbrauches im state 4 ist immer ein Zeichen für die entkoppelnde Wirkung einer Substanz.

1 0 2 / 1 9 8 scheint in diesem Falle die am besten verträgliche Substanz zu sein. Eine totale Entkoppelung der Atmung von der ATP-Produktion trat erst in einer Dosierung von 0,45 m molar auf.

P e n t a m i d i n führte bereits im Bereich von 0,3 m molar in einem von drei Versuchen zur kompletten Entkoppelung.

1 9 2 / 1 8 8 , als am schlechtesten verträgliche Substanz, entkoppelte schon bei einer 0,1 m molaren Konzentration.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.51, Tab. 2.51.1 und 2.51.2 graphisch dargestellt.

Abb. 2.52 stellt den Funktionszustand der Mitochondrien nach 3 Minuten Einwirkung der Diamidine, ausgedrückt als RCR, dar.

Gestrichelt: der vermutlich weitere Verlauf der Kurve.

2.6.4.8 Zusammenfassung und Diskussion des orientierenden Versuches zur Mitochondrienatmung

Die Untersuchungen mit Lebermitochondrien der Ratte haben gezeigt, daß die getesteten trypanociden Diamidine im Sinne eines *E n t k o p p l e r s* wirken können.

Dies drückt sich aus in einem Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate pro Minute im state 4 (Stimulation der Zellatmung ohne ADP-Zusatz), als sicheres Zeichen, und in einem Abfall der Sauerstoffverbrauchsrate pro Minute im state 3, was heißt, daß auch weniger *A T P* gebildet wird. Als Resultante dieser beiden Parameter vermindert sich der RCR-Wert.

Hemmungen von Enzymen des Citratcyclus und Eiweißstrukturen der oxidativen Phosphorylierung durch Amidine und Guanidine sind sehr frühzeitig vermutet und dann auch beschrieben worden (43,113,116,122,166,198,219,238).

Auf Grund der kationischen Strukturen der Diamidine und ihrer, im Gegensatz zu den aliphatischen Guanidinen, erhöhten Lipophilie, käme eine intensive Bindung an die Membranen von Mitochondrien in Frage.

Gemäß dem Modell nach P. Mitchell wäre eine Entkoppelung der Phosphorylierung wie folgt denkbar:

Durch die Bindung an Lipidstrukturen der Membran kommt es zu einer Ladungsverschiebung zwischen Innen- und Außenseite der inneren Mitochondrienmembran. In vollständig gekoppelten Mitochondrien ist der Sauerstoffverbrauch über den Protonengradienten direkt mit der

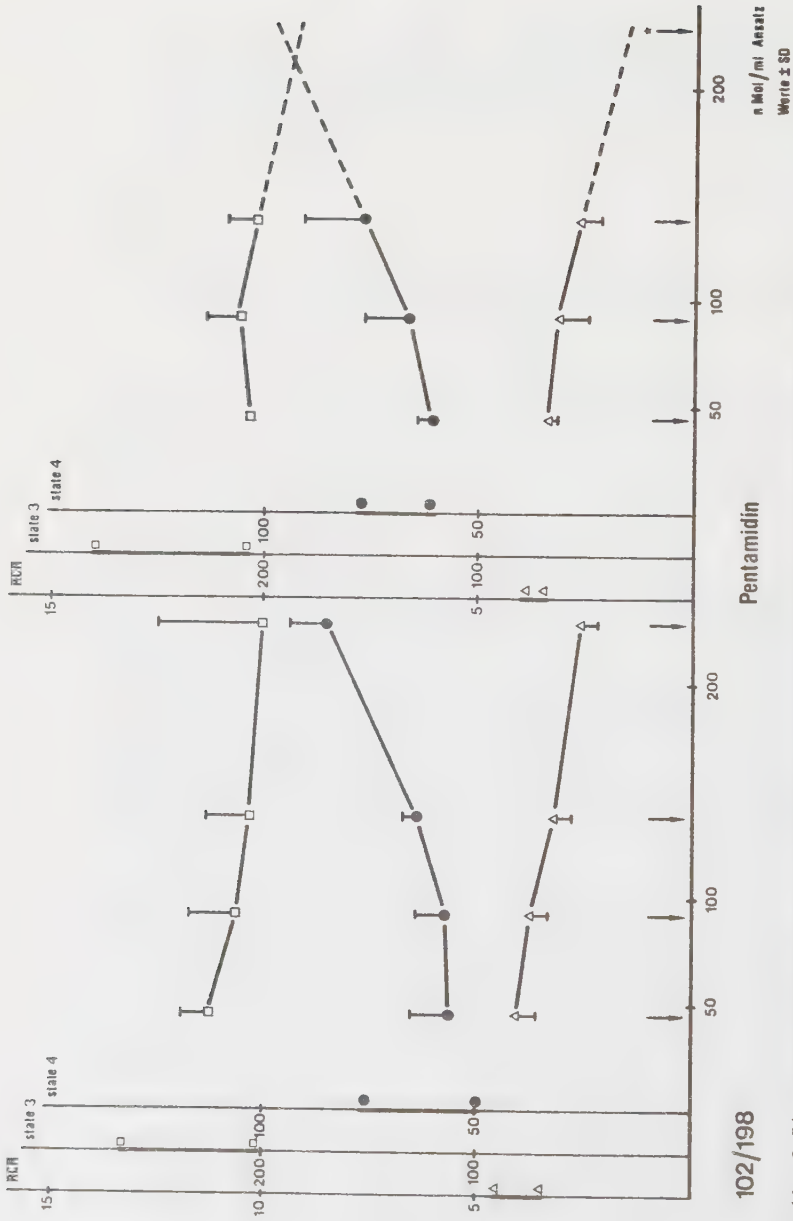


Abb. 2.51 Sauerstoffverbrauchsrate isolierter Mitochondrien aus Rattenlebern in state 3 (□) und state 4 (●) und Atmungskontrollquotient (RCR) (Δ) für steigende Konzentrationen von 102/198 und PENTAMIDIN; an den Ordinaten sind die Streubereiche der Kontrollversuche aufgetragen; *) einer von drei Versuchen bereits vollkommen entkoppelt

Substanz: 102 / 198		Substrat: Succinat 20 μl / 0,5 m	
		ADP: 400 nMol	
Konzentration nMol/ml Ansatz	Sauerstoffverbrauchsrate $\text{nMol O}_2 / 2 \text{ min}^{-1} \text{ 100 } \mu\text{l}^{-1} \text{ MS}$		RCR
	state 4	state 3	
46	56,5 $\pm$ 9,4	225,3 $\pm$ 14,5	4,05 $\pm$ 0,4
92	57,3 $\pm$ 7,1	212,2 $\pm$ 27,0	3,80 $\pm$ 0,5
138	64,7 $\pm$ 1,9	207,0 $\pm$ 20,4	3,21 $\pm$ 0,4
228	85,2 $\pm$ 8,6	201,3 $\pm$ 42,4	2,64 $\pm$ 0,4
Kontrolle	63,3 $\pm$ 14,2	235,7 $\pm$ 33,8	4,06 $\pm$ 0,63

Tab. 2.51.1 Sauerstoffverbrauchsrate von isolierten Mitochondrien aus Rattenleber nach 102/198, 3 Minuten Inkubation;
RCR = Atmungskontrollquotient
Werte $\pm$ SD; Einzelwerte ergeben sich als Mittelwert aus 2-4 Messungen

Substanz: Pentamidin		Substrat: Succinat 20 μ l / 0,5 m ADP: 400 nMol	
Konzentration nMol/ml Ansatz	Sauerstoffverbrauchsrate nMol $O_2/2 \text{ min}^{-1}$ 100 μ l $^{-1}$ MS	RCR	
	state 4	state 3	
46	60,5 $\pm$ 3,5	206,3 $\pm$ 2,3	3,42 $\pm$ 0,23
92	66,4 $\pm$ 11,7	212,0 $\pm$ 16,7	3,19 $\pm$ 0,73
138	77,0 $\pm$ 14,1	204,6 $\pm$ 15,3	2,73 $\pm$ 0,59
Kontrolle	68,5 $\pm$ 8,3	243,9 $\pm$ 36,2	3,67 $\pm$ 0,28

Tab. 2.51.2 Sauerstoffverbrauchsrate von isolierten Mitochondrien aus Rattenleber nach PENTAMIDIN, 3 Minuten Inkubation;
RCR = Atmungskontrollquotient
Werte $\pm$ SD; Einzelwerte ergeben sich als Mittelwert aus 2-4 Messungen

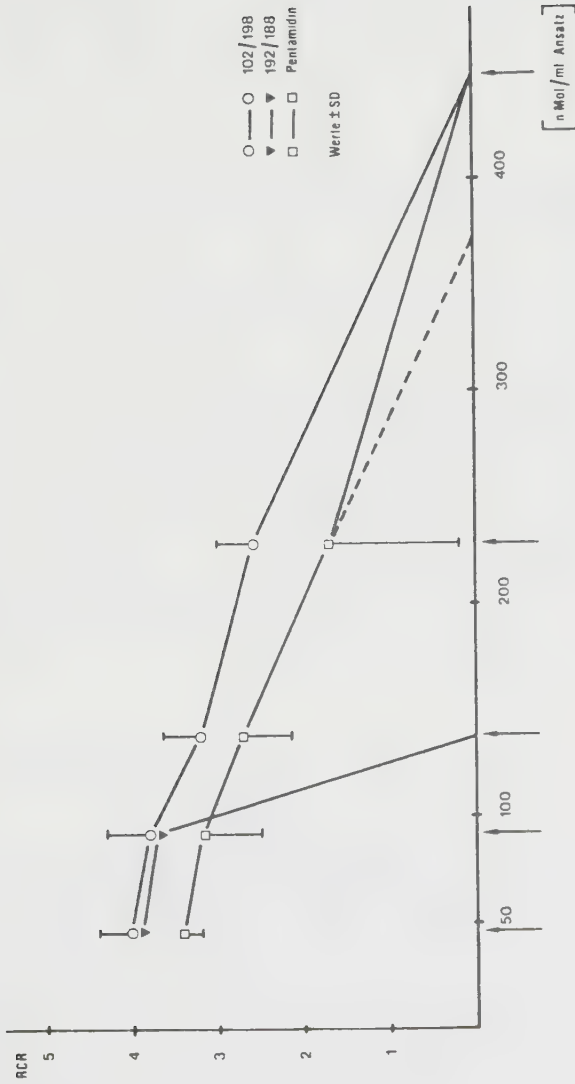


Abb. 2.52 Funktionszustand isolierter Mitochondrien aus Rattenleber nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von 102/198, 192/188 und PENTAMIDIN; für RCR = Null, vollkommene Entkopplung der ATP-Synthese von der Endoxidation; Pfeile (↓) bedeuten verwendete Konzentrationen

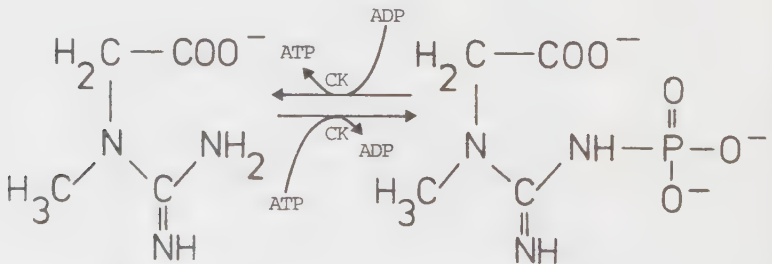
Phosphorylierung von ADP verbunden. Eine Verschiebung der Potentialdifferenz zwischen Innen- und Außenseite zu positiveren Werten führt simultan zur Verminderung des Protonengradienten und damit zur Verminderung der treibenden Kraft für die Phosphorylierung von ADP (123, 198).

Bei den getesteten Substanzen führte die etwas höhere Lipophilie von 192/188 offensichtlich bereits in niedrigeren Dosen zur Entkoppelung, was theoretisch zu erwarten war.

Nicht auszuschließen sind letztlich weitere inhibitorische Eigenschaften der untersuchten Diamidine in der glykolytischen Kaskade, im Citratcyclus und der Endoxidation. Um dies zu klären, müßten noch detailliertere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Interaktion von trypanociden Diamidinen im Energiesystem der Muskelzellen wäre eine direkte Hemmung solcher Enzyme, die direkt an der ATP-Bereitstellung beteiligt sind.

Hier käme theoretisch eine Hemmwirkung auf die Creatinkinase (CK) in Betracht, da Creatin selbst eine Amidin-Struktur besitzt.



2.6.5 Untersuchungen zur Hemmwirkung von Diamidinen auf Enzymsysteme

2.6.5.1 Energiesystem kontraktiler Elemente

Ein r u h e n d e r Muskel deckt seinen Energiebedarf hauptsächlich aus dem Abbau von Fettsäuren, dabei wird ATP kontinuierlich aus ADP rephosphoryliert.

Neben der ATP-Synthese durch oxydative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien haben Muskeln ein weiteres System, welches bei akutem Bedarf schnell Energie für Kontraktionen zur Verfügung stellt:

den C r e a t i n p h o s p h a t s p e i c h e r.
Creatinphosphat liegt im Skelettmuskel in 4-facher, im Herzmuskel in 1,5-facher Menge gegenüber ATP vor (s. Abb. 2.53).

Konzentration von ATP
und Creatinphosphat
in verschiedenen Muskeltypen

Abb. 2.53

Muskelart	ATP (mmol/kg Gewebe)	Creatin- phosphat (mmol/kg Gewebe)
Skelettmuskel	5	20
Herzmuskel	1,5	2
Glatte Muskel	2	0,7

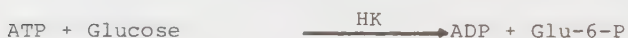
Bei s c h n e l l e r Muskelbelastung wird ATP zunächst aus Creatinphosphat rephosphoryliert. Das Schlüsselenzym ist in diesem Fall die cytosolische C r e a t i n - K i n a s e (CK_C). Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der ATP-Bildung.

Während der Erholungsphase wird im Muskel ATP zur Rephosphorylierung von Creatin zu Creatinphosphat verbraucht. Diese Reaktion wird wahrscheinlich hauptsächlich von der auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran sitzenden Creatin-Kinase (CK_{em}) katalysiert.

Eine Hemmung der Creatinkinasen durch Diamidine würde also die für den Muskel unbedingt notwendige primäre Reserve an energiereichem Phosphat blockieren.

2.6.5.2 Messungen zur CK-Hemmung

Die Untersuchungen zu den Hemmwirkungen der Diamidine 102/198, 192/188, Pentamidin und 261/115 auf die Creatin-Kinase wurden nach U . B e r g m e y e r (16) durchgeführt (Versuchsbeschreibung s. Kap. 4.10). Als Substrat wurde Creatinphosphat in 23 und 35 m molarer Konzentration und Glucose 20 m molar verwendet. Die Versuche wurden bei 25° C mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen durchgeführt. Das Gesamtsatzvolumen war bei allen Versuchen gleich. Die gesamte Reaktionsgleichung für das Enzymsystem lautet:



CK = Creatin-Kinase

HK = Hexokinase

Glu-6-P-DH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Glu-6-P = Glucose-6-phosphat

2.6.5.3 Messungen zur Hemmung des gekoppelten Enzymsystems HK/Glu-6-P-DH

Im gewählten Testsystem befanden sich außer der Creatinkinase noch zwei weitere Enzyme.

Da eine Reaktion der Verbindungen mit diesen Enzymen Auswirkungen auf die Gesamtreaktion haben mußte, wurden

diese beiden Enzyme getrennt von der CK untersucht.
Die Gesamtgleichung für die entsprechenden Ansätze lautet:



Die Reaktionsbedingungen waren mit den für CK bereits beschriebenen identisch, nur wurde statt ADP eine äquimolare Menge ATP in den Test eingesetzt und CP sowie CK weggelassen.

2.6.5.4 Erstellen einer realen Hemmkurve für CK und HK/Glu-6-P-DH

Für die untersuchten Substanzen wurden reale Hemmkurven für CK erstellt.

Hierzu wurden folgende Konzentrationen der Diamidine verwendet:

102/198	:	7,4;	15;	22;	29;	37	µmol
192/188	:	7,4;	15;	22;	29;	37	µmol
Pentamidin	:	148;	300;	440;	590;	740	µmol
261/115	:	148;	300;	440;	590;	740	µmol

Für 102/198 und 192/188 konnten höhere Konzentrationen nicht getestet werden, da hier bereits Fällungen im Inkubationsmedium auftraten. Im Gegensatz dazu traten bei Pentamidin und 261/115 bis zur 20-fachen (740 µmol) Dosis keine Fällungen auf.

Die aus den Versuchen erhaltene Restaktivität wurde gegen die Dosis linear aufgetragen und eine Regressionsgerade berechnet.

In den Test zur Messung der Hemmung der HK/Glu-6-P-DH wurden die gleichen Konzentrationen der Testsubstanzen eingesetzt.

2.6.5.5 Ermittlung der ID₅₀ für das gewählte Testsystem

Die Inhibitormenge, die im Test bei 35 m molarer CP-Konzentration das Enzymsystem zu 50% hemmte, wurde als ID₅₀ bezeichnet.

Ermittelt wurde dieser Wert über die bei der Erstellung der realen Hemmkurven ermittelten Regressionsgeraden in der Art, daß der reell ermittelte oder der aus dem Kurvenverlauf extrapolierte Schnittpunkt der linearen Kurven mit der 50%-Achse abgelesen wurde (s. Abb. 2.54).

2.6.5.6 Feststellung des Hemmtyps

Zur Feststellung des Hemmtyps der Inhibitoren im gewählten Testsystem wurde die Methode nach D i x o n (62) angewendet.

Hierbei werden graphisch steigende Inhibitorkonzentrationen gegen den reziproken Wert der Umsetzungsgeschwindigkeit/Minute ($\Delta E/\text{Minute}$) eines Enzyms aufgetragen. Die Geraden zweier verschiedener Substratkonzentrationen schneiden sich entweder:

- a) im ersten Quadranten eines Koordinatenkreuzes, was einer kompetitiven Hemmung entspricht oder
- b) auf der x-Achse des ersten Quadranten, was einem nicht-kompetitiven Antagonismus gleichkommt.

2.6.5.7 Ergebnisse der Hemmversuche

Stärkster Hemmstoff des CK-Enzymsystems war 192/188, gefolgt von 102/198 und 261/115.

261/115, das phenylverkürzte Analogon zu 102/198, war ca. 20 mal schwächer wirksam.

PENTAMIDIN zeigte keine Hemmung (s. Tab. 2.55).

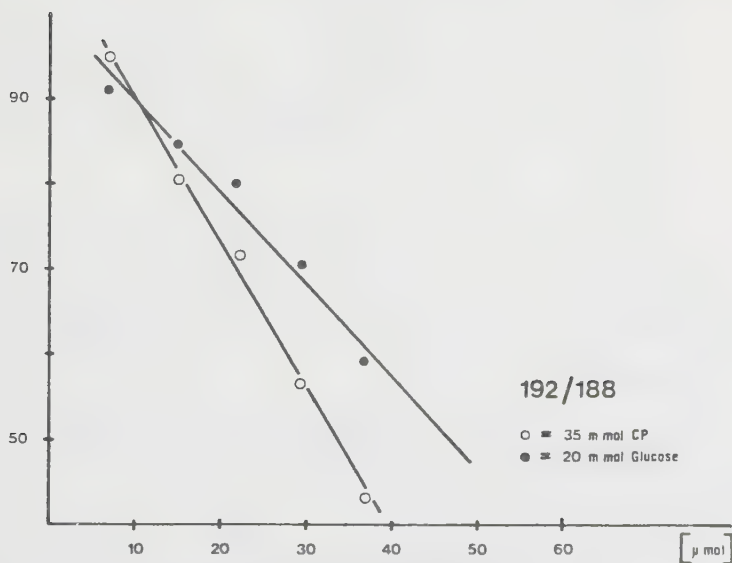
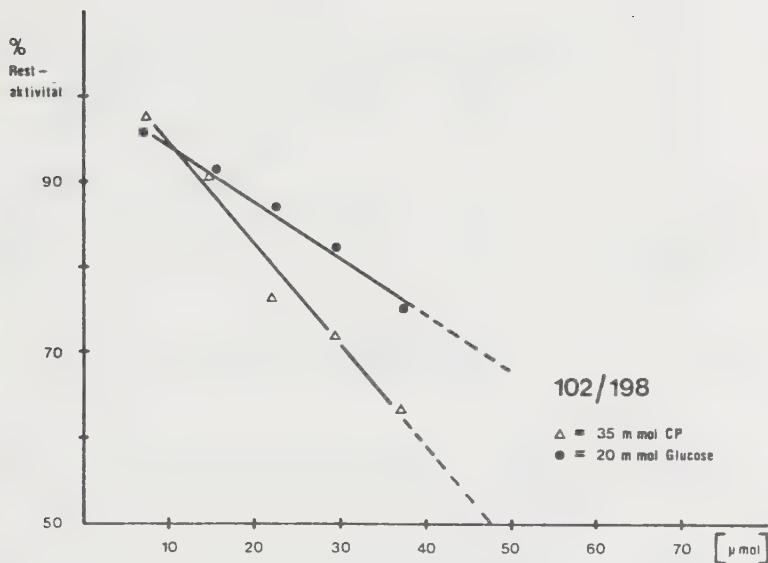


Abb. 2.54 Reale Hemmkurven von Creatin-Kinase (CK), ($\Delta, \circ$)
 Substrat: Creatinphosphat (CP) und
 HK/Glu-6-P-DH ($\bullet$)
 Substrat: Glucose
 mit 102/198 und 192/188

102/198, 192/188 und 261/115 scheinen kompetitive Hemmstoffe im gewählten System zu sein, wobei der Kurvenverlauf im Dixon-plot bei 192/188 in höheren Dosen nicht mehr linear war (Abb. 2.56 und 2.57).

Um die Einwirkung der Inhibitoren auf die CK von der Wirkung auf die anderen Enzyme HK und Glu-6-P-DH abzugrenzen, wurde der Hemmquotient a berechnet (Tab. 2.55)

$$a = \frac{ID_{50}\text{-HK/Glu-6-P-DH-System}}{ID_{50}\text{-Gesamtsystem}}$$

a kann somit als Affinitätsparameter für die unterschiedlichen Enzyme der einzelnen Reaktionsschritte gelten.

Je größer a , desto größer ist die Affinität zur Creatinkinase und damit die spezifische Hemmung der CK, was eine stärkere Beeinträchtigung der Energiegewinnung bedeutet. 102/198 mit dem höchsten Quotienten ($a=1,64$), stellt somit die Substanz mit der relativ höchsten Affinität zur CK im getesteten Enzymsystem dar, wenngleich 192/188 den stärkeren Hemmeffekt auf das gesamte System besitzt.

Aus der relativ kleinen ID_{50} HK/Glu-6-P-DH für 192/188 (Tab. 2.55) kann geschlossen werden, daß die starke Hemmeigenschaft im Gesamtsystem zu großen Teilen auf die Hemmung eines dieser (oder beider) Enzyme zurückzuführen ist.

Substanz	ID_{50} μmol		KI-Wert μmol n. Dixon (212)	Hemmquotient a ($a \geq 1$)
	CK	HK/ Glu-6-P-DH		
102/ 198	47,8	78,6	25	1,64
192/188	33,3	46,8	20	1,40
Pentamidin	-	-	-	-
261/115	1055	1529	-	1,44

Tab. 2.55

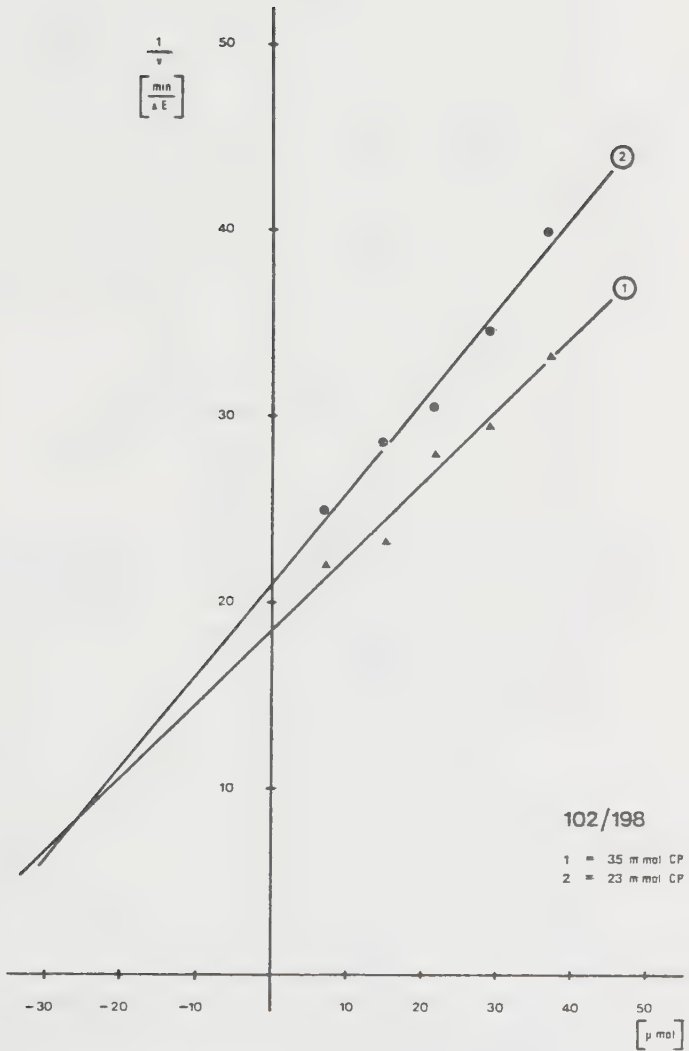


Abb. 2.56 Dixon-Auswertung zur Bestimmung des Hemmtyps von 102/198 im gewählten Enzymsystem Creatin-Kinase/Hexokinase/Glu-6-P-Dehydrogenase
Substrat: Creatinphosphat (CP)

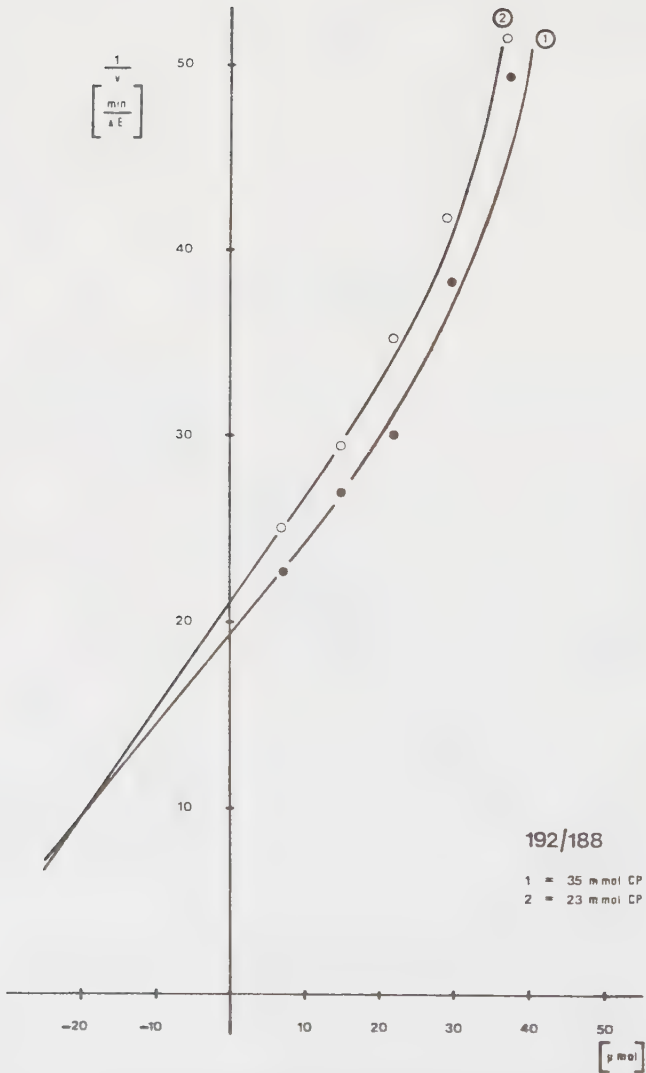
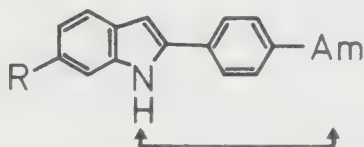


Abb. 2.57 Dixon-Auswertung zur Bestimmung des Hemmtyps von 192/188 im gewählten Enzymsystem Creatin-Kinase/Hexokinase/Glu-6-P-Dehydrogenase
Substrat: Creatinphosphat (CP)

Interessant ist die in diesem Test fehlende Hemmeigenschaft von Pentamidin und die geringe Aktivität von 261/115 gegenüber 102/198.

Möglicherweise ergeben sich hier bestimmte Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Da 261/115 gegenüber 102/198 in 2-Stellung am Indolring keine Phenylgruppierung besitzt, könnte hier der Abstand zwischen der NH-Gruppierung des Indolring-systems und der in 2-Stellung entweder mit oder ohne Phenylring orientierten Amidino-Gruppierung für die Wirkungsstärke eine Rolle spielen.



Dies könnte erklären, weshalb 261/115 wesentlich schwächer und Pentamidin (kein Indolgerüst) überhaupt keine Hemmwirkung zeigt.

2.7 Messung klinisch-chemischer Blutwerte bei der Maus nach Behandlung mit trypanociden Diamidinen

Die aus den histologischen Untersuchungen am Gefäß und aus den Atmungsversuchen mit isolierten Mitochondrien gewonnenen Erkenntnisse einer möglichen Interaktion der Diamidine mit Membranstrukturen läßt erwarten, daß diese Substanzen nicht nur die Funktion von Herz und Gefäßen, sondern weitgehend unspezifisch auch andere Organe schädigen. Dies sollte sich in einer Veränderung bestimmter Blutparameter äußern.

Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu bestätigen, wurden deshalb einige orientierende Versuche durchgeführt, mit deren Hilfe Zellschäden, z. B. der Leber, erkannt werden sollten.

Geeignet hierfür ist die Bestimmung von Serumenzymen, die im Blut normalerweise nur in geringer Konzentration frei vorkommen und deren verstärktes Auftreten ein Anzeichen von Membranschäden ist.

Wegen der schon erwähnten Lebertoxizität der Diamidine boten sich vor allem leberspezifische Enzyme an, wie z. B. die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT).

2.7.1 Serumenzyme

2.7.1.1 Vorkommen, Pathologie

Zahlreiche Enzyme sind spezifische Bestandteile von Körperzellen, wobei verschiedene Enzyme in unterschiedlichen Organen organspezifische Unterschiede erkennen lassen, u. U. katalysieren, wenn auch in manchem ähnliche, so doch im einzelnen unterschiedliche Enzymproteine die gleiche Reaktion. Solche multiplen Enzymformen werden auch Isoenzyme genannt.

Der normale Gehalt des S e r u m s an zellulären Enzymen ist relativ niedrig, da diese Enzyme aus intakten Zellen nicht oder nur in geringen Maße austreten können. Die Aufrechterhaltung des Konzentrationsunterschiedes im Enzymgehalt zwischen Zelle und Serum ist eine Frage der Funktionsfähigkeit der Zellmembran.

Einschränkungen der zellulären Energiebereitstellung führen in der Regel zu Störungen oder Schäden der Zellmembran, was einen passiven Austritt von Enzymen aus dem Zellinneren (36,191) zur Folge hat, wobei die Höhe des Anstiegs der Enzymaktivität mit der Schwere und Ausbreitung der Schädigung einhergeht (156).

2.7.1.2 GOT / S-GOT

Die im Cytosol und in den Mitochondrien vorkommende Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartataminotransferase, GOT) ist ein organspezifisches Enzym mit hohen Aktivitäten in Leber, Herz und Muskulatur. Beim Menschen verhalten sich die Aktivitäten von Leber/Herz/Muskulatur in etwa wie 1 : 0,5 : 0,38 (U/g Frischgewicht) (192).

Das Auftreten hoher GOT-Aktivitäten im Serum kann deshalb auf eine Funktionsstörung vor allem der Leberzellmembranen hindeuten. Solche Funktionsstörungen treten z. B. auf bei

- a) infektiösen Prozessen in der Leber (Hepatitisen)
- b) degenerativen Leberveränderungen (Fettleber, Zirrhose)
- c) Arzneimittel-induzierten Schäden.

2.7.2 Veränderungen des S-GOT-Gehaltes nach Gabe von trypanociden Diamidinen

2.7.2.1 Methode

20 - 30 g schweren, männlichen NMRI-Mäusen wurden 0,01 ml/g KG, der wegen ihrer teilweisen Schwerlöslichkeit in Aqua ex amp. gelösten Diamidine, 102/198, 192/188 und Pentamidin in Konzentrationen von 10 und 30 mg/kg KG i. p. verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge an physiologischer Kochsalzlösung.

Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden die Tiere getötet (s. Kap. 4.1) und das gewonnene Serum sofort weiterverarbeitet. Die Messung der Aktivität wurde nach (59) (s. Kap. 4.2) in Mikroliter-Technik durchgeführt.

2.7.2.2 Ergebnisse

Nach einer Dosis von 10 mg/kg KG konnte bei Pentamidin keine signifikante Abweichung des S-GOT-Gehaltes vom Normalwert (bei der Maus 60-90 U/l) gefunden werden. 192/188 führte 4 und 48 Stunden p. i. zu leichten Erhöhungen der S-GOT, während bei Substanz 102/198 die 4- und 8 Stunden-Werte nur leicht erhöht waren.

Sehr viel deutlicher waren die Veränderungen nach einer Dosis von 30 mg/kg KG.

Hier konnten Ähnlichkeiten zwischen Pentamidin und 102/198 festgestellt werden. Es ergaben sich für beide Substanzen Maxima bei 8 Stunden p. i. mit Werten von 80 U/l bzw. 250 U/l über dem Wert der nichtbehandelten Kontrolltiere. 192/188 führte bereits nach 4 Stunden zu einem Maximum mit ca. 190 U/l über dem Kontrollwert (s. Abb. 2.58 bis 2.60 und Tab. A.2.8 bis A.2.13 im Anhang).

Die Ergebnisse zeigen, daß Dosen, die auch cardiotoxisch waren (30 mg 102/198 - Base = $6,5 \times 10^{-5}$ Mol), zu einem

deutlichen Anstieg der S-GOT führen.

Dieses Enzym ist zwar nicht ausschließlich leberspezifisch, da es aber in der Leber in besonders hoher Konzentration vorliegt, legt dieser Befund die Annahme einer Leberschädigung nahe.



Abb. 2.58 Veränderungen der S-GOT bei der Maus nach PENTAMIDIN 10 und 30 mg/kg KG i. p.
(vgl. auch Tab. im Anhang)

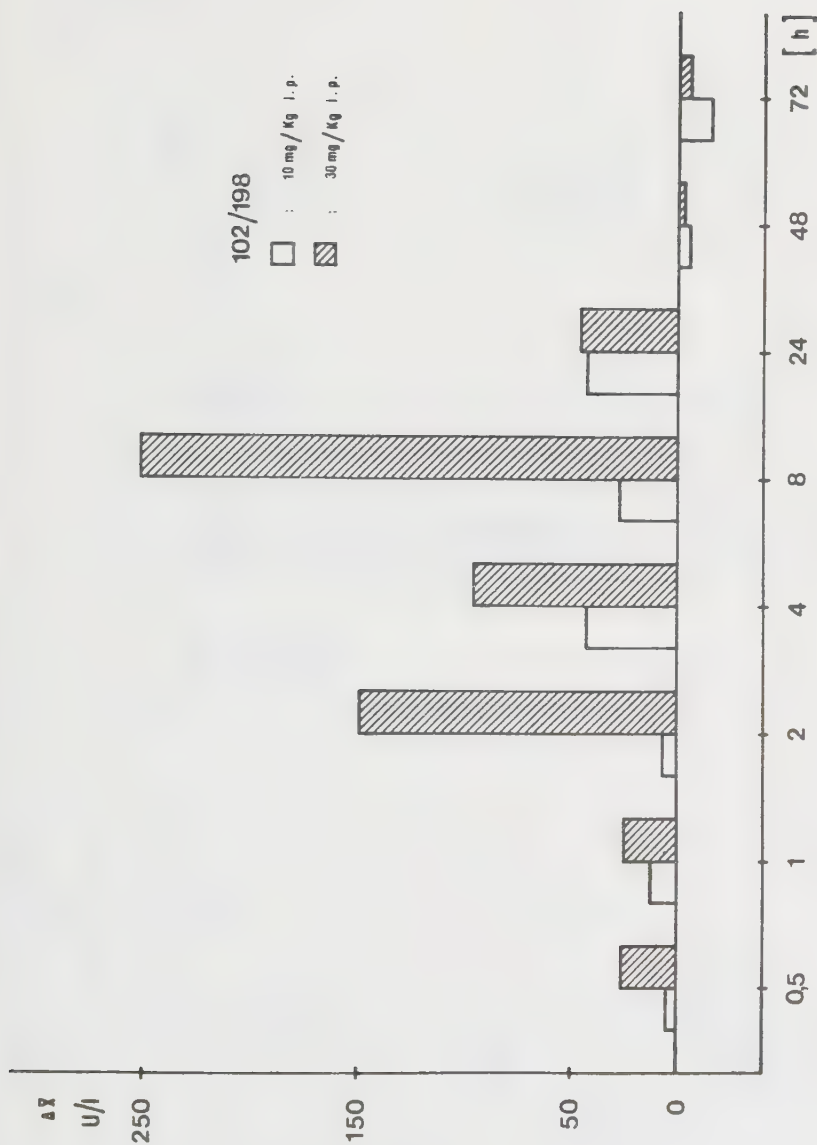


Abb. 2.59 Veränderungen der S-GOT bei der Maus nach 102/198 10 und 30 mg/kg KG i. p.
(vgl. auch Tab. im Anhang)

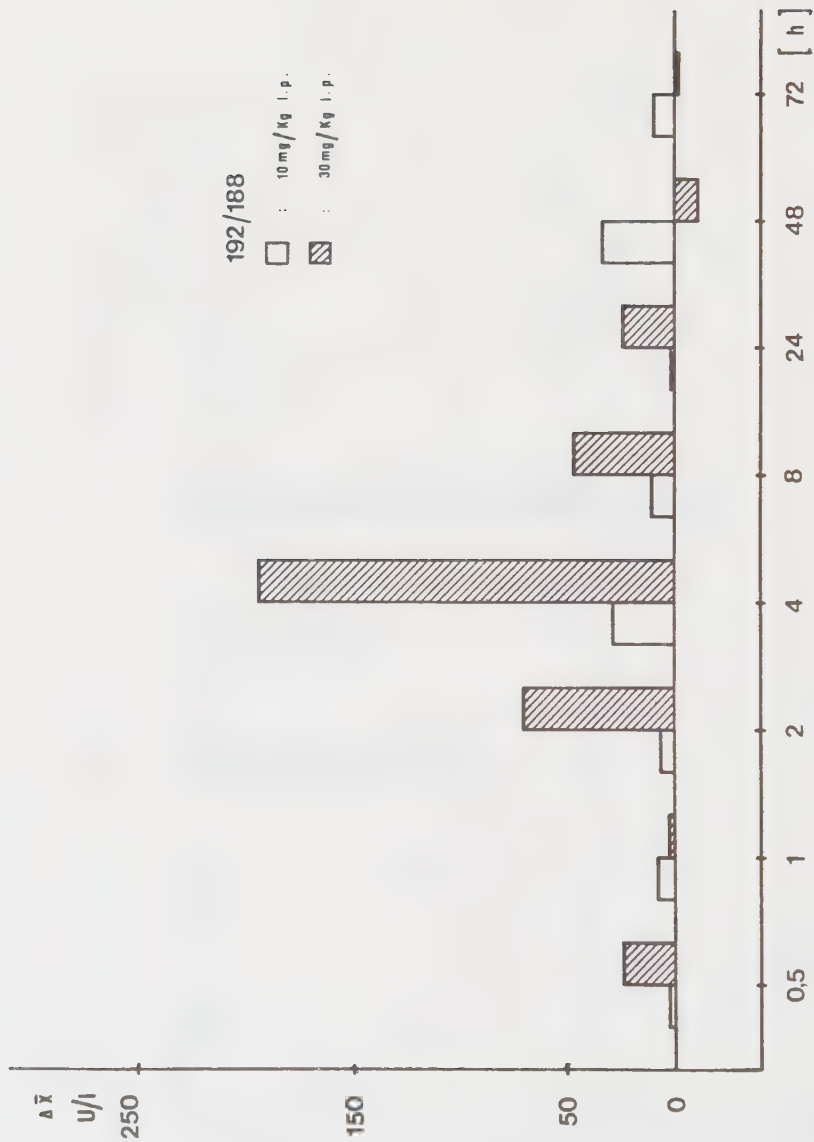


Abb. 2.60 Veränderungen der S-GOT bei der Maus nach 192/188 10 und 30 mg/kg KG i. p.
(vgl. auch Tab. im Anhang)

2.7.3 Serumlipide

2.7.3.1 Serumtriglyceride

Als weiteren möglicherweise für eine Leberschädigung typischen Parameter wurden Triglyceride im Serum bestimmt, da deren Höhe zu einem erheblichen Teil von der Leberfunktion (Sekretion von Lipoproteinen) mitbestimmt wird.

2.7.3.2 Ergebnisse

Die Untersuchungen zum Serumtriglyceridspiegel konnten jedoch keine eindeutige Korrelation zur Behandlung mit Diamidinen und Diimidazolininen zeigen.

Die Werte streuten in beiden Dosierungen (10 und 30 mg/kg KG) ohne systematische Tendenz um den Kontrollwert, so daß aus diesen Versuchen keine eindeutigen Aussagen zu erhalten waren.

2.7.4 Serumglucose

Ein Einfluß auf den Blutzuckerspiegel durch die getesteten Verbindungen war aus folgenden Gründen zu erwarten:

1. Guanidin-Derivate, aus denen die Diamidine entwickelt worden waren, senken den Blutzuckergehalt (SYNTHALIN, METFORMIN, PHENFORMIN);
2. durch den Blutdruckabfall, den die Verbindungen bei der i. v.-Applikation auslösen, kommt es zu einer sympathischen Gegenregulation, die in der Leber zu verstärktem Glycogenabbau führt, was normalerweise einen Anstieg des Blutzuckergehaltes zur Folge hat;
3. da eine Störung der oxidativen Phosphorylierung den Pasteur-Effekt (Unterdrückung der Glycolyse) aufhebt, kommt es zu einem verstärkten Glucoseabbau und u. U. zur Verminderung des Blutglucosegehaltes;
4. eine unspezifische Membranschädigung im Pankreas könnte möglicherweise die Insulinausschüttung reduzieren und damit den Glucosegehalt des Blutes steigern.

2.7.4.1 Veränderungen des Serumglucosespiegels nach Diamidinbehandlung

2.7.4.1.1 Methode

Die Applikation der verwendeten Diamidine Pentamidin, 102/198 und des Diimidazolins 192/188 erfolgte wie unter 2.7.2.1 beschrieben (s. auch Kap. 4.3).

Die Bestimmung des Blutglucosegehaltes erfolgte mit der GOD-Perid[®]-Methode (Boehringer).

2.7.4.1.2 Ergebnisse

Nach Verabreichung von 10 mg/kg KG Substanz zeigte sich nur bei 102/198 nach 2 Stunden eine statistisch signifikante Zunahme der Blutglucosewerte (s. Abb. 2.61 bis 2.63 und Tab. A.2.14 bis A.2.19 im Anhang). Die Blutglucosewerte bei Pentamidin- und 192/188-behandelten Tieren lagen bei dieser Konzentration im Streubereich des Kontrollwertes.

Bei einer Dosis von 30 mg/kg KG wirkten, in Analogie zur S-GOT, Pentamidin und 102/198 ähnlich. So kam es zu einer Erhöhung der Blutglucose-Konzentration mit Spitzenwerten von 25 mg/dl bzw. 65 mg/dl über dem Normalwert 2 Stunden p. i. und anschließender, leicht hypoglycämischer Phase 8 Stunden p. i. 192/188 führte auch hier früher zu höheren Werten. Der Spitzenwert von 62 mg/dl über dem Kontrollwert war bereits 1 Stunde p. i. erreicht.

Diese Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden:

1. Der Anstieg der Glucosekonzentration im Blut nach einer (192/188) oder zwei Stunden (Pentamidin, 102/198) ist wahrscheinlich nicht Ausdruck der physiologischen Gegenregulation auf Grund der Blutdrucksenkung, da eine so vermittelte Zunahme der Blutglucose früher sichtbar werden müßte. Möglicherweise spielt eine Störung der Pankreas-(β -Zell)-Funktion eine Rolle.
2. Der nachfolgende Abfall der Glucosekonzentration geht parallel mit dem Anstieg der Transaminasen im Blut. Dies könnte Ausdruck der entkoppelnden Eigenschaften der Substanzen sein.

Durch die Störung der Membranfunktion kommt es zur Entkopplung und damit zum Umschalten des Organismus auf glycolytische Energiegewinnung, was sich in einem verstärkten Verbrauch von Glucose bemerkbar macht und zum Abfall des Blutglucosespiegels führen kann.

Pentamidin
 □ : 10 mg/kg i.p.
 ▤ : 30 mg/kg i.p.

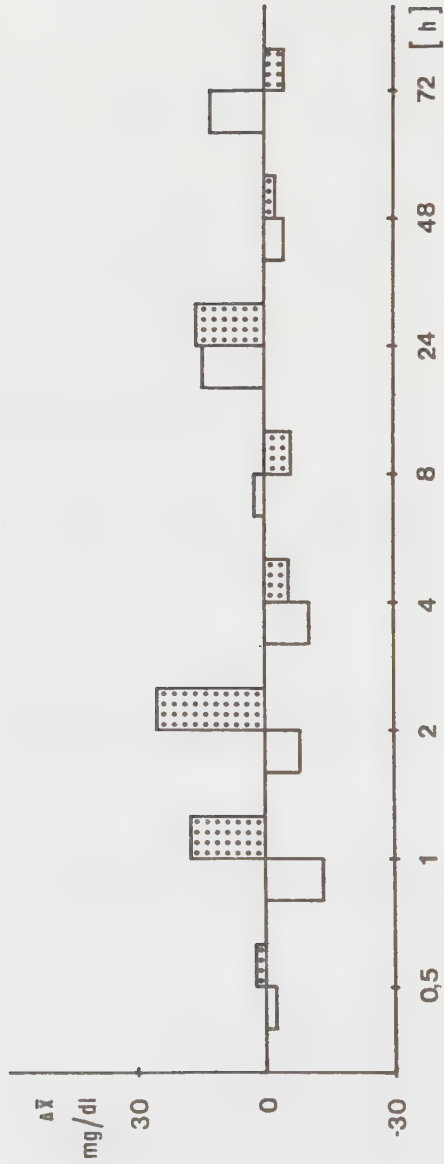


Abb. 2.61 Veränderungen der Blutglucosewerte bei der Maus nach PENTAMIDIN 10 und 30 mg/kg KG i. p.
 (vgl. auch Tab. im Anhang)

102/198

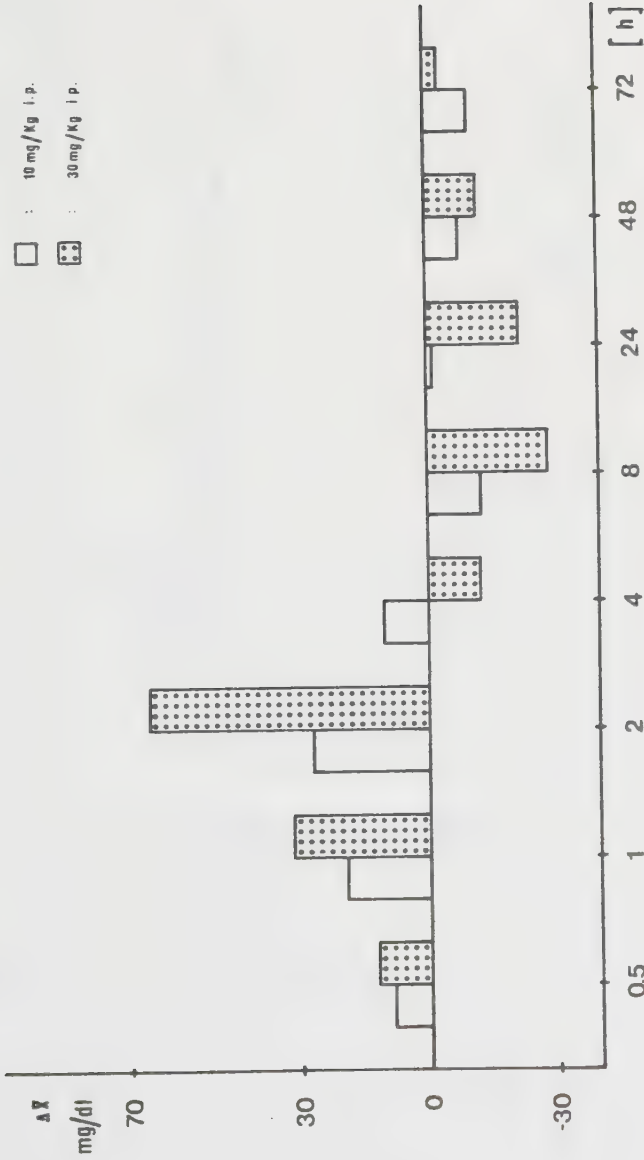


Abb. 2.62 Veränderungen der Blutglucosewerte bei der Maus nach 102/198 10 und 30 mg/kg KG i. p.
(vgl. auch Tab. im Anhang)

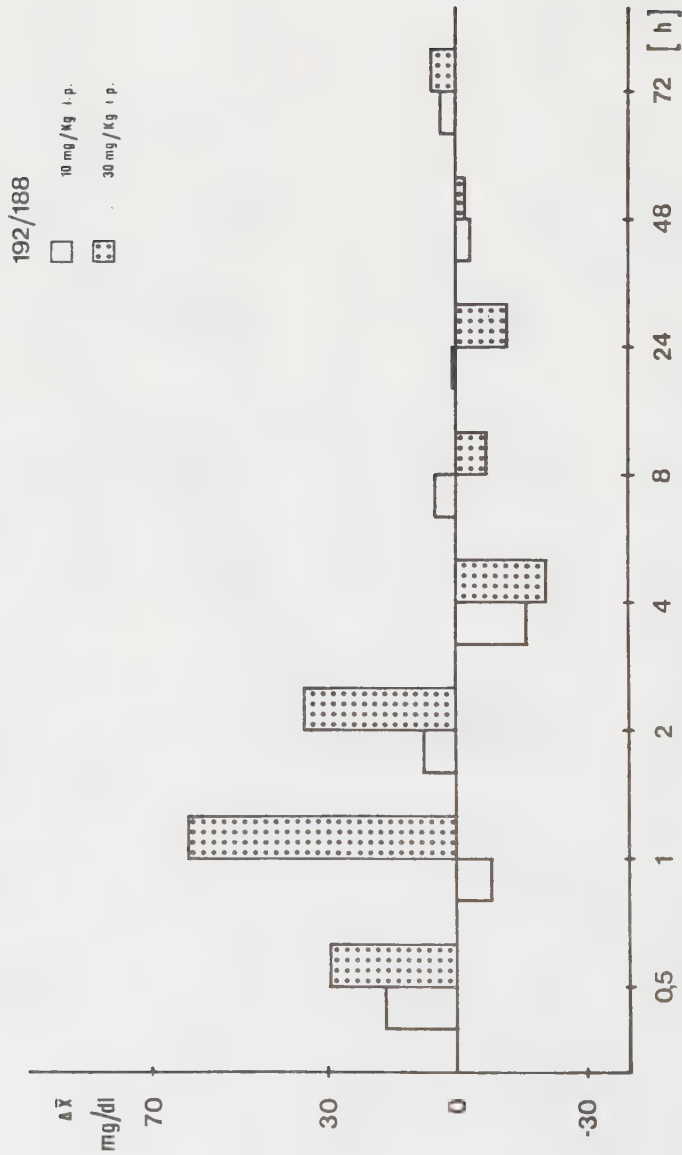


Abb. 2.63 Veränderungen der Blutglucosewerte bei der Maus nach 192/188 10 und 30 mg/kg KG i. p.
(vgl. auch Tab. im Anhang)

2.8 Diskussion

Die unerwünschten Herz- und Kreislauffeffekte der untersuchten Substanzen auf den intakten Organismus können anhand der gezeigten Ergebnisse besser erklärt werden, als dies bisher möglich war. Auf Grund der Untersuchungen wurden verschiedene Angriffspunkte für die Diamidine neu aufgezeigt bzw. bestätigt.

Der h y p o t e n s i v e Effekt trypanocider Diamidine ist eng korreliert mit der biskationischen Struktur der Verbindungen und stellt im zeitlichen Ablauf der toxischen Erscheinungen nach Diamidingabe den p r i m ä r e n Affekt, insbesondere bei intravenöser Applikation, dar. Die nach Gabe der von uns verwendeten Substanzen aus dem Dann'schen Arbeitskreis beobachtete Blutdrucksenkung entspricht prinzipiell den von anderen Autoren mit ähnlichen Substanzen erzielten Effekten [Wien (239), Giumaraes et al. (101), Geratz et al. (91), Fußgänger et al. (84), Bielenberg (23)]. Es kommt zu Vasodilatation, zu Blutdruckabfall durch Reduktion des peripheren Widerstandes und zu physiologischer Gegenregulation in Form einer Tachycardie.

Diese Symptomatik wurde von den meisten der genannten Autoren ebenfalls beobachtet. Die jetzt vorgenommenen Messungen der Herzauswurfleistung i n v i v o ergaben aber keine Vermehrung, sondern eine Verminderung derselben, eine Tatsache, die für das i s o l i e r t e Herz i n v i t r o in bestimmten Dosisbereichen, auch von Bielenberg (23) und Fußgänger et al. (84) erwähnt wird.

Eine Bestätigung für die Beeinflussung der myocardialen Kontraktionsfähigkeit findet sich auch in den Befunden von Kaduk (125) und Gercke (92), die ausgeprägte Veränderungen an den energieliefernden Organellen und den kontraktilel Elementen des Herzens feststellen konnten.

Damit besteht die Kreislaufwirkung der Amidine aus mindestens zwei Angriffspunkten:

1. einem vasalen Effekt, der, wie von uns gezeigt werden konnte, ganz überwiegend auf einer kompetitiven Blockierung adrenerger α -Rezeptoren beruhen dürfte, bei einigen Stoffen zum Teil wohl auch auf einer direkten oder indirekten Stimulierung von Histaminrezeptoren. Diese Effekte führten zu einer Senkung des peripheren Widerstandes.
2. einem myocardialen Teileffekt durch Ausbildung einer verminderten Herzleistung, die, wie gezeigt werden konnte, von massiven EKG-Veränderungen begleitet wird.

Die festgestellten *e l e k t r o c a r d i o g r a -*
p h i s c h e n Veränderungen entsprechen einer hypoxischen Störung innerhalb der Herzmuskulatur [Manning et al. (151), Penney et al. (167), Hundt et al. (117), So (194), Börger (30)].

Hypoxien können über verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, da die mechanische Aktivität der kontraktilen Elemente

- a) vom Stoffwechsel der energiereichen Phosphate abhängt und damit
- b) mit dem tatsächlichen Sauerstoffangebot verknüpft ist.

Für einen Sauerstoffmangel infolge eines verminderten Coronarflusses, Absinken des O_2 -Partialdruckes, Anämien etc. gab es während der Versuche keine Anzeichen, so daß nur eine Hemmung der ATP-Synthese über eine verminderte enzymatische ATP-Bereitstellung in Frage kommt, was Fleckenstein (75) unter dem Überbegriff *M a n g e l -*
i n s u f f i z i e n z zusammenfaßt.

Becker (11) bezeichnet diesen Zustand als *h i s t o -*

t o x i s c h e d y s e n z y m a t i s c h e
H y p o x y d o s e.

Ort der ATP-Synthese sind die Mitochondrien. Insofern ist es interessant, daß Kaduk (125) und Gercke (92) nach DAPI-Behandlung massive Veränderungen an den Mitochondrien beschreiben konnten, die in der Regel eine Reduktion bzw. eine Auflösung der Cristae zeigten.

Bezüglich des Mechanismus der Schädigung der Mitochondrienmembran und der nachfolgenden kontraktile Insuffizienz sind mehrere Möglichkeiten denkbar:

1. Eine gestörte Proteinsynthese.

Da Diamidine bevorzugt an AT-reiche DNA binden [Williamson D.H. et al. (241), Brack et al. (33), Newton (159)] und mitochondriale DNA AT-reicher als Kern-DNA ist, reichern sich die Diamidine besonders in den Mitochondrien an (5,213,242), so daß es dort über eine intermitochondriale RNA-Synthese-Hemmung zur Verminderung der Proteinsynthese von Zellbausteinen kommen kann. Die Schädigung kann damit letztlich auf einen Enzymmangel (z. B. Cytochrome der Endoxydation) zurückzuführen sein.

Dies würde jedoch einen relativ langsam eintretenden Schaden bedeuten. In Anbetracht der nahezu a u g e n b l i c k l i c h e n Schädigung erscheint dieser Mechanismus fraglich.

2. Eine Interaktion mit Membranen.

Die für die Funktion der Mitochondrien wichtigen Membranen sind reich an basophilen Phospholipiden und Proteinen.

Eine d i r e k t e Interaktion mit solchen Strukturen erscheint wahrscheinlich, zumal die Bindung von Diamidinen an Phospholipide bekannt ist [Williamson (242,243), Macadam et al. (146,147), Jaffe (118), Heischkeil (108)].

In der bekannten Bilayer-Struktur der Membranen könnten sich die gestreckten, planaren, biskationischen Diamidine im Sinne einer *I n t e r k a l a - t i o n* in die Membran ein- oder auch außen auflagern und ihre Funktion, z. B. Permeabilität für bestimmte Ionenflüsse, stören.

3. Eine Utilisationsinsuffizienz.

Mitochondrien sind Calciumspeicher [Lehniger (136)], die neben dem sarkoplasmatischen Retikulum die zur Muskelkontraktion notwendigen Ca^{++} -Ionen bereitstellen. Eine Hemmung der Ca^{++} -Speicherfähigkeit der Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulums, möglicherweise durch Interaktion der Diamidine mit Membranstrukturen, führt zu Ca^{++} -Ionen-Verarmung in den Mitochondrien und im sarkoplasmatischen Retikulum sowie zu einer Reduktion der Ca^{++} -Rückspeicherung in diese Zellbestandteile. Ca^{++} -Mangel im sarkoplasmatischen Retikulum bedeutet aber eine verminderte elektromechanische Koppelung der kontraktilen Strukturen und damit eine Verminderung der Kontraktionskraft und des kontraktilen Grundtonus. Fleckenstein (75) bezeichnet dies als *U t i l i s a t i o n s - i n s u f f i z i e n z*. Diese kann sich relativ rasch entwickeln.

Ein solches Bild kann allerdings nur dann entstehen, wenn das aus den Speichern freigesetzte Ca^{++} durch die Ca^{++} -ATPase aus der Zelle transportiert wird. Dies ist wiederum eine ATP-abhängige Leistung. Wird das energieliefernde System blockiert, kommt es normalerweise zu einer nachfolgenden Dauerkontraktion der kontraktilen Elemente.

Kaduk (125) konnte solche Überkontraktionen als *l o k a l b e g r e n z t e* Ereignisse am Herzen nach Gabe von 10 mg/kg KG 150/49 nachweisen, so daß sich an der Herzmuskulatur offensichtlich eine generelle Relaxation der Muskulatur mit fokalen Überkontraktionen überlappt und die Störung bei der Ausbreitung

geordneter Aktionspotentiale im Muskel, wie im EKG sichtbar wurde, erklärbar werden.

Für die a k u t e und r e t a r d i e r t e Toxizität scheint somit die Membraninteraktion der Diamidine d a s ausschlaggebende Kriterium zu sein.

Auch Biguanide, die ja der Ausgangspunkt der Diamidinforschung waren, besitzen identische membran-schädigende Eigenschaften [Schäfer (197)]. Bei den Diamidinen kommt die zusätzliche Fähigkeit hinzu, P r o t e i n e direkt zu denaturieren [Fulton et al. (79), Kopac (133)].

Möglicherweise spricht auch die Wirkungsgradation linearer aliphatischer Biguanide mit verschiedenen Kettenlängen, gegenüber Trypanosomen-Infektionen bei Mäusen [King et al. (129)], für eine solche Interaktion durch transmembranären Einschub, in dem Sinne, daß für eine optimale trypanocide Effizienz bei dieser Substanzgruppe ein bestimmter Abstand der beiden Guanidino-Gruppen gegeben sein muß.

Von einer solchen Membran-Wechselwirkung lassen sich prinzipiell viele der bekannten toxischen Erscheinungen der Diamidine ableiten, von denen für die primäre Affektion die H e m m u n g d e r Z e l l a t m u n g bzw. die B e r e i t s t e l l u n g v o n E n e r g i e in Form von energiereichen Phosphaten wichtig ist.

Wie sich von uns zeigen ließ, wirken die Diamidine im Sinne eines Entkopplers.

Ein möglicher Mechanismus der e n t k o p p e l n d e n Fähigkeit der Diamidine wurde bereits diskutiert (s. Kap. 2.6.4.7). Ein entkoppelnder Mechanismus wurde auch für Terephthalanilide der Fa. Wander beschrieben [Pine et al. (164)], einer Verbindungsklasse, die bei der Synthese der Diimidazoliny-Verbindungen Pate stand.

Entkoppler verhindern die oxidative Energiegewinnung, weshalb es zur Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel (verstärkte Glycolyse mit Abbau der Glycogenspeicher) kommt. Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels ist das Lactat.

Die histologisch nachgewiesene Glycogenverarmung im Herzen [Kaduk (125)], sowie in der Leber [Wien (240)] spricht ebenfalls für das Umschalten des Metabolismus auf anaerobe Glycolyse.

Die von Synthalin bekannte verstärkte Lactatbildung [Broom (35)] konnte auch für PENTAMIDIN beschrieben werden [Eaton (67)], so daß bei einer gleichzeitig gestörten Resynthese von Glycogen [Minot (155), Junkersdorf et al. (124), Schäfer (198), Steiner et al. (219)] das Bild einer von den Biguaniden bekannten Lactacidose entstehen kann.

Auf die Hemmung der ATP-Synthese läßt sich auch das Phänomen der Hemmung des P a s t e u r - E f f e k t e s [Dickens (61), Williamson (244)] durch Guanidine und Diamidine zurückführen.

Werden für den Muskel zusätzlich noch die Energiereserven (Creatinphosphat) unzugänglich und kommt es weiterhin zu einer ionalen Verbindung der Diamidine mit den anionischen Gruppen energiereicher Phosphate im Sinne einer Salzbildung, einer Reaktion, die wir für verschiedene Diamidine nachweisen konnten und die auch für PENTAMIDIN beschrieben ist [Makulu et al. (149)], so ist nahezu das gesamte energieliefernde System blockiert.

Die von Kaduk (125) beschriebene Dilatation der Herzhöhlen wäre dann wohl auch die Folge des verringerten Angebotes an energiereichen Phosphaten.

Diese Dilatation ist ein sicheres Zeichen eines gesenkten Muskeltonus (das Herz "latscht" auseinander) [Fleckenstein (75)].

Falls ein solcher Energieverlust eintreten würde, wäre er sicher nicht auf das Herz beschränkt, sondern wäre auch an anderen Organen zu erwarten. An der Gefäßmuskulatur würde er zu einem Tonusverlust führen, ein Effekt, der sich unter hohen Amidindosen offensichtlich in Form einer nichtkompetitiven Hemmung einer durch Noradrenalin induzierten Gefäßkontraktion in vitro zeigt [Bielenberg (23)].

Dementsprechend wäre auch die Unwirksamkeit einer prophylaktischen Vasopressin (ADH)-Gabe erklärbar. Für den aus den Screeningversuchen bekannten negativen Einfluß von Vasopressin auf das gesamte Kreislaufgeschehen, können als Erklärung Ergebnisse von Hatano et al. (106) herangezogen werden. Sie benutzten Vasopressin als Modells substanz zur Erzeugung anginöser EKG-Bilder, d. h. hier liegt mit den Diamidinen vermutlich ein additiver Effekt vor.

Neben der Wirkung auf das Energiesystem könnte noch ein Ca^{++} -inhibitorischer Effekt die deletäre Wirkung der Diamidine auf kontraktile Elemente verstärken. Hinweise für einen Eingriff an Ca^{++} -speichernden Organellen geben eigene Erkenntnisse (histologischer Hinweis einer möglichen Bindung an sarkoplasmatische Strukturen der Aorta) und Ergebnisse von Kaduk (125) (bläschenförmige Erweiterung im sarkoplasmatischen System einer Herzmuskelzelle bereits 30 Minuten p. i.). So ist es denkbar, daß Einlagerungen von Diamidinen in die Membran, so wie sie von Weissmann et al. (236) für Stilbamidin beschrieben wurden, zu einer verstärkten Rigidität und unter Umständen zur Hemmung der normalen Ionenflüsse durch die Membranen führen können. Dem würde die von Wien (239) gefundene protektive Wirkung einer Calciuminfusion vor Diamidingabe entsprechen.

Wie die vermehrte Herzauswurfleistung am Herzen durch sehr niedrige Dosen der Diamidine zustande kommt, bleibt in den Einzelheiten ungeklärt. Eine Möglichkeit ist, hierin einen kompensatorischen Effekt auf die Blutdrucksenkung, also eine Ausschüttung von Noradrenalin/Adrenalin mit nachfolgender Tachycardie zu sehen, wie Untersuchungen mit anderen hypoxieerzeugenden Agentien vermuten lassen. Penney et al. (167) konnten bei CO-beatmeten Ratten ähnliche Steigerungen des Herzminutenvolumens beobachten.

Neben den akuten Kreislauffeffekten gibt es toxische Erscheinungen, deren faßbare Resultate erst nach einer gewissen Latenzzeit nach der Diamidin-Applikation auftreten. Hierzu gehört sicherlich die Hemmung von Enzymen, wie die Trypsin-, ACH-Esterase, Monoaminoxidase-Hemmung u. a. Ähnliches gilt für DNA-Bindungen, wenngleich solche Interaktionen an der verzögerten Toxizität der Diamidine sicherlich einen großen Anteil haben und für die eigentliche Trypanocidie der Substanzen vermutlich mit ausschlaggebend sind [Williamson (243), Macadam et al. (144,145, 146,147), Kolb (132), Minet (154), Harbaum-Neuhaus (104), Schürger (211)].

Verzögert treten auch Veränderungen im Blutglucosespiegel nach Gabe von Diamidinen auf. Während niedrige Dosen kaum einen Einfluß haben, verursachen hohe Dosen der untersuchten Verbindungen zunächst eine Erhöhung des Glucosespiegels. Hierfür gibt es verschiedene Interpretationsmöglichkeiten:

- a) Anstau der Glucose infolge gesteigerter Glycogenolyse oder verringerter Glycogen-Synthese in der Leber,
- b) Verminderung der Insulinsekretion durch Schädigung der β -Zellen im Pankreas.

Ersterer Fall erscheint unwahrscheinlich, da durch das Umschalten des Organismus auf anaerobe Atmung die Glycolyse gesteigert ist, so daß hier eher mehr Glucose verbraucht wird. Eine Stimulierung der Glycogenolyse durch reflektorische Sympathikuseffekte wurde wegen des relativ spät einsetzenden Effektes schon als nicht wahrscheinlich diskutiert (Kap. 2.7.4).

Für die zweite Möglichkeit könnten die Tatsachen sprechen, daß nach Diamidinbehandlung Diabetes-Erkrankungen auftraten [Bryceson (37), Bouchard Ph.(32)] und nach GUANIDIN-Applikation an Hunden verminderte Organgewichte des Pankreas gefunden wurden (124).

Die nachfolgende Tendenz zur Hypoglycämie dürfte den von den Biguaniden bekannten Effekten zuzuschreiben sein:

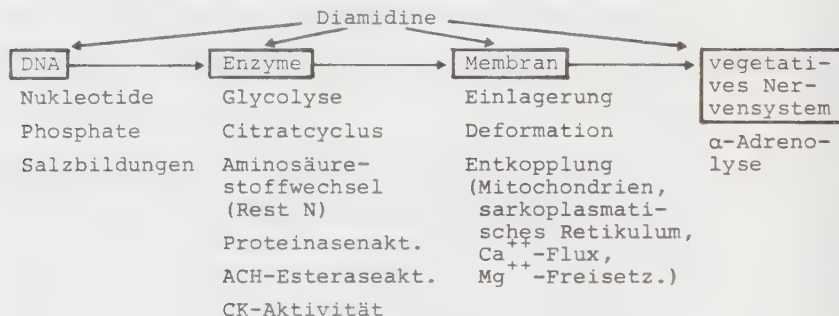
- a) einer Verminderung der Glucose-Resorption im Darm. einem energieabhängigen, aktiven Prozess,
- b) einer Verminderung der Pyruvat-Translokation vom Cytosol ins intakte Mitochondrieninnere und damit Hemmung der Gluconeogenese und des Citratcyclus (131,197) oder
- c) einem vermehrten Verbrauch an Glucose durch Hemmung des aeroben Stoffwechsels und Steigerung der Glycolyse.

Der gleiche Ablauf der Blutglucosespiegelschwankung konnte an Hunden nach Guanidin-Gabe von Junkersdorf (124) festgestellt werden.

Als weiteres Zeichen dafür, daß zwischen Einwirkzeit und einer unspezifischen Zellläsion, die durch Diamidine verursacht wird, ein Zusammenhang besteht, geht aus dem Anstieg der Serumtransaminasen nach 4-8 Stunden hervor, deren Auftauchen im Serum immer als Vorgang einer eingeschränkten Zellmembranfunktion betrachtet werden muß.

Die beschriebenen und literaturbekannten Wirkungen trypanocider Diamidine zeigen, daß die Toxizität dieser Substanzgruppe m u l t i f a k t o r i e l l bedingt ist.

Einen e i n z i g e n Angriffspunkt im Zellgeschehen, wie bei den Penicillinen eindrucksvoll demonstriert, gibt es bei den Diamidinen offenbar nicht. Das vielfältige Wirkspektrum der Verbindungen scheint sich jedoch auf Grund der beschriebenen Eigenschaften auf wenige g r u n d s ä t z l i c h e Angriffspunkte zurückführen zu lassen:



Als Kuriosum dieser Substanzklasse verbleibt jedenfalls die Tatsache, daß aus einer vermutlich toxischen Nebenwirkung des Synthalins in der Folgezeit ein Therapiekonzept entwickelt wurde, dessen Möglichkeiten sicherlich noch nicht ausgeschöpft sind.

So sind Variationen der Molekülstruktur wünschenswert mit dem Ziel, Verbindungen zu schaffen, bei denen bei verringerter Nebenwirkungsrate dem Wirtsorganismus gegenüber ein hohes Potential parasitärer Toxizität bewahrt bleibt.

So wäre es z. B. interessant, den lipophilen Mittelteil der gestreckten, planaren Moleküle sterisch so zu verändern, daß eine Interaktion mit Membranen schlechter stattfinden kann.

Erste, mögliche Hinweise gibt eine Molekülstruktur wie 313/40, eine in 3-Stellung des Indolgrundgerüsts aminosubstituierte Verbindung. Sie zeigt deutlich geringere

toxische Effekte (s. Abb. 2.1). Unter Beibehaltung der für die trypanocide Wirkung notwendigen bis-kationischen Struktur könnte auf diese Art vielleicht das Nebenwirkungsspektrum etwas verkleinert werden. Daß solche Wege gangbar sind, zeigt das "Herauszüchten" der blutglucosesenkenden Komponente bei den Biguaniden im Phenformin und Metformin.

B) EXPERIMENTELLER TEIL

3. Allgemeine Angaben

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Mäuse

Für die enzymatischen Tests wurden männliche NMRI-Mäuse von 20-25 g Gewicht verwendet. Die Tiere hatten ein Alter von 7-10 Wochen.

Sie wurden in Kunststoffkäfigen mit Sägemehleinstreu in Gruppen von 8-10 Tieren, bei einer konstanten Raumtemperatur von 25° C, gehalten. Gefüttert wurde mit Standardfutter (Herilan MRH[®]) und Leitungswasser ad libitum.

Durchgeführt wurden die Versuche in den Monaten März bis Juni.

3.1.2 Ratten

Blutdruckuntersuchungen wurden an männlichen und weiblichen Wistar-Ratten, Stamm Hannover, von 250-350 g KG durchgeführt. Für die Gewinnung der Lebermitochondrien wurden die gleichen Tiere verwendet.

Ernährung und Haltungsbedingungen waren, wie unter 3.1.1 beschrieben.

Pro Kunststoffkasten wurden maximal 4 Tiere gehalten.

3.1.3 Meerschweinchen

Als Organspender für die Versuche an der Aortenspirale wurden dreifarbige Glatthaar-Meerschweinchen aus eigener Zucht verwendet. Die Haltung erfolgte in Kunststoffkäfigen mit einer Bodenfläche von 34 x 55 cm.

Gefüttert wurde mit Standardfutter Herilan MS[®], Haltung, Leitungswasser wurde ad libitum angeboten.

3.2 Chemikalien, Lösungsmittel

Alle erwähnten Chemikalien wurden in p. a. Qualität oder in der reinsten, erhältlichen Form verwendet. Als Wasser wurde stets zweifach in Glasapparaturen destilliertes Wasser, für Lösungen zur Injektion Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung ex amp. verwendet. Carbogen ist ein Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂. Es wurde in Stahlflaschen (Fa. Linde, Nürnberg) bezogen.

3.3 Verwendete Hilfsmittel

pH-Meter pH 391, der Fa. WTW, Weilheim, mit einer kombinierten Glaselektrode für pH-Messungen, Analysenwaage Typ B5 der Fa. Mettler, Ultraschallbad Sonorex RK 100 der Fa. Bandelin, Zwei- und Dreikanalschreiber der Fa. Linseis, Selb, Pipetten der Fa. Eppendorf, Hamburg, mit 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500 und 1000 µl Festvolumen, variable Pipetten (Finnpipetten) 50-200 µl, 200-1000 µl, Pipettenspitzen gelb und blau der Fa. Greiner und Fa. Sarstedt, Halbmikro-Plastikküvetten der Fa. Greiner, Glasküvetten für UV-Absorption, Quarzküvetten zur Fluoreszenzanalyse, Fluoreszenzlampe der Fa. Desaga, Heidelberg, Rectalthermometer der Fa. Ellab, OP-Lampe der Fa. Mach, Typ 132 QZ1, OP-Tisch, beheizt, Polypropylenschläuche PP 20, PP 30, der Fa. Portex, England, Einmalkanülen der Fa. Terumo, Einmalspritzen der Fa. Terumo, ND-Polyethylengefäße mit Schraubdeckel, 30 ml, der Fa. Zinsser, Laborzentrifuge (Mikro-Hämatokrit/Typ 912, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz), Eppendorfgefäße mit Deckel,

Hämatokrit-Röhrchen, heparinisiert, der Fa. Terumo,
Hawsley Mikro-Hämatokrit Zentrifuge,
Hawsley Mikro-Hämatokrit Reader,
Monovetten, EDTA-K, Fa. Sarstedt,
Druckaufnehmer Statham SP 37 und P 23 AA der Fa.

Statham Medical Instr., Heto Rey, Puerto Rico,
Chir. Nahtmaterial (Flexafil[®], 6/0, 0,45 m, Fa.

Pfrimmer),

Dauerkatheter (Schmetterlinskatheter) der Fa.

Terumo und Abbott.

Weitere Gerätebeschreibungen in den entsprechenden
Kapiteln.

4. Versuchsbeschreibungen

4.1 Gewinnung von Serum

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch getötet, decapitiert und das Blut in einem eisgekühlten, verschließbaren Eppendorfgeläß gesammelt.

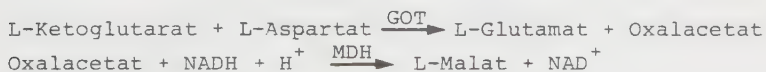
Nach 5 Minuten Standzeit im Eis wurde 15 Minuten in einer Laborzentrifuge das Serum abgetrennt und vorsichtig abpipettiert.

Die Proben wurden, falls nicht sofort verarbeitet, bei -70° C eingefroren.

4.2 Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GOT

Die Bestimmung der S-GOT-Werte wurde nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (59) durchgeführt. Verwendet wurde das Test-Kit der Fa. Boeringer, Mannheim, Monotest® GOT opt.

Testprinzip



MDH = Malatdehydrogenase

Meßansatz

Meßstrahlung : 365 nm
Schichtdicke : 1 cm
Testvolumen : 600 µl
Testtemperatur : 25° C
Photometer : Zeiss PM6
Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

in eine Küvette pipettieren	μl
Reagenzgemisch	500
Serum	100
mit Plastikspatel mischen, nach 1 Minute E_0 , nach 2, 3 und 4 Minuten E_1 , E_2 und E_3 ablesen	

Reagenzgemisch

Phosphatpuffer	: 78 m mol, pH 7,4
L-Aspartat	: 194 m mol
NADH	: 0,18 m mol
MDH	$\geq$ 0,6 U/ml
LDH	$\geq$ 1,2 U/ml
L-Ketoglutarat	: 12 m mol

Berechnung

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach der Formel

$$\text{U/l} = 1756 \times \Delta E/\text{min}$$

4.3 Bestimmung des Serumglucosegehaltes

Der Serumglucosegehalt wurde mit der Methode von W e r n e r et al. (237) durchgeführt. Zur Verwendung kam das Test-Kit GOD-Perid[®] der Fa. Boehringer, Mannheim.

Testprinzip



GOD = Glucoseoxidase

POD = Peroxidase

ABTS[®] = 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)

Probenvorbereitung

Das erhaltene Serum wurde mit URAC[®] (Uranylacetat) der Fa. Boehringer, Mannheim, enteiweißt und in Eppendorf-Gefäßen bis zur Weiterverarbeitung bei -70° C eingefroren.

Reagenzien

Standard

Glucose 9,1 mg/dl = 0,505 m mol

Reaktionsgemisch

Phosphatpuffer : 100 m mol, pH 7,0

Peroxidase ≥ 0,8 U/ml

Glucoseoxidase ≥ 10 U/ml

ABTS[®] : 1 mg/ml

Messung gegen Leerwert (LW)

Versuchsablauf

	LW [μl]	Standard [μl]	Probe [μl]
Aqua dest.	50	-	-
Standard	-	50	-
Probe	-	-	50
Reaktionsgemisch	1000	1000	1000

Reaktionsgefäß verschließen, mischen und 25-50 Minuten bei 20-25° C stehen lassen.
Extinktion der Probe (E_{Probe}) und des Standards (E_{Standard}) gegen Leerwert (LW) messen.

Berechnung

Die Berechnung des Glucosegehaltes erfolgte nach der Formel:

$$c = 100 \times \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ mg/dl}$$

4.4 Bestimmung des Blutdrucks an der wachen Ratte

Die Bestimmung des Blutdrucks an wachen Ratten wurde mit einem BP-Recorder 8005 der Fa. W+W-Electronics AG, Basel, durchgeführt (93). Über das Meßprinzip gibt Abb. 4.1 Aufschluß.

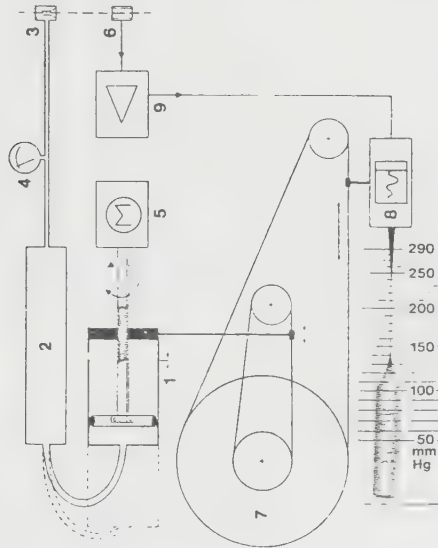


Abb. 4.1

Über den Schwanz einer in einem Fixierkäfig sitzenden Ratte wird eine aufblasbare Manschette (Gärtner-Cuff, 3) und anschließend ein piezoelektrischer Aufnehmer (6) geschoben. Die Manschette wird durch das Vor- und Zurückfahren eines Stempels in einem Zylinder (1) aufgeblasen oder entlastet. Über eine Transmissionsscheibe (7) ist damit der Thermo-schreiber (8) verbunden. Dieser erhält aus dem Piezoaufnehmer die Druckimpulse über einen Verstärker (9), der gleichzeitig die Impulszahl digital angibt. Unter Ver-

wendung eines entsprechend geeichten Thermopapieres kann der systolische Blutdruck direkt abgelesen werden, wobei der Wert beim Sistieren der Druckpulsation als Meßgröße betrachtet wird.

Wegen der Vasodilatation und der besseren Pulsation unter Wärmeeinfluß können exakte Werte am besten bei wärmebehandelten Tieren erhalten werden.

Der Schwanz der zu messenden Ratte wird deshalb mit einer Wärmelampe auf einer Temperatur von 37° C gehalten.

Die Methode bringt es mit sich, daß ein exakter Wert nur dann zu erhalten ist, wenn die Ratte absolut ruhig sitzt, da jegliche Bewegung vom Piezoaufnehmer registriert wird und teilweise ein Ablesen der Druckwerte unmöglich macht.

Aus diesem Grunde wurden die Tiere ca. eine Woche vorher an die Versuchsbedingungen (Manschette und Druckaufnehmer) gewöhnt ("trainiert").

4.5 Versuchsaufbau beim Blutdruckscreening und der Messung der Beeinflussung des Blutdrucks durch das Narkosemittel

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Applikation von 1,3 g/kg KG Ethylurethan ($\text{NH}_2\text{-CO-OC}_2\text{H}_5$) narkotisiert. Die Narkose trat in der Regel innerhalb von 2-5 Minuten ein. Anschließend wurden die Tiere auf einen beheizten OP-Tisch gelegt und die Körpertemperatur über ein Rektalthermometer kontrolliert und bei 37° C gehalten.

Die Tiere waren nicht gefesselt, da jegliche Fixation das Ergebnis veränderte.

Über den Schwanz wurde zunächst die Druckmanschette, anschließend der piezoelektrische Aufnehmer des BP-Recorders 8005 geschoben.

Zur Untersuchung des Narkosemitteleinflusses wurden nun die Messungen, wie in 2.3.1.2 und 4.4 beschrieben, vorgenommen.

Für Messungen des Blutdrucks nach Vorbehandlung mit möglichen Antagonisten wurde zusätzlich ein venöser Zugang in eine Schwanzvene über einen Dauerkatheter (Schmetterlingskatheter, Fa. Terumo oder Abbott) geschaffen, über den die Substanzen verabreicht wurden. Der Katheter blieb bis zum Versuchsende liegen.

4.6 Hämatokrit-Bestimmung des Rattenblutes

Eine männliche bzw. weibliche Ratte wurde getötet und decapitiert. Das Blut wurde in Manovetten der Fa. Sarstedt, die K-EDTA zur Blutgerinnungshemmung enthielten, gesammelt. Im Labor wurde das nicht geronnene Blut in Hämatokritröhrchen überführt und in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hawsley Mikro-Hämatokrit Centrifuge) zentrifugiert.

Der Erythrozytenanteil konnte anschließend mittels einer einfachen Schablone (Hawsley Mikro-Hämatokrit Reader) abgelesen werden.

4.7 Versuchsaufbau zur blutigen Druckmessung, Bestimmung des Venendrucks und der Flußrate

4.7.1 Blutige Messung des arteriellen Drucks und Bestimmung der Herzfrequenz

Die Versuchstiere (250-350 g), männliche und weibliche Wistar-Ratten, wurden wie unter 4.5 beschrieben, narkotisiert und vorbereitet.

Mit Schere und Pinzette wurde die Haut in der ventralen Halsregion, sowie das Unterhaut- und Fettgewebe durchtrennt und nach Längsspaltung der Halsmuskulatur die Trachea freipräpariert. Nach Eröffnung durch einen Einschnitt wurde sie mittels eines kurzen PVC-Schlauchstückes intubiert. Anschließend wurden die Arteria carotis communis sinistra und - dextra stumpf freipräpariert.

Die linke A. carotis wurde distal der vorgesehenen Eröffnungsstelle abgebunden und proximal mit einer Klemme verschlossen. Nach dem Eröffnen des Gefäßes wurde ein mit einem Gemisch von 0,9% NaCl-Lösung/Heparin gefüllter PP 30-Schlauch (Fa. Portex) eingeführt und durch eine Fadenschleife und Verknotung arretiert. Der PP-Schlauch war mit einem Druckaufnehmer (Statham SP37)

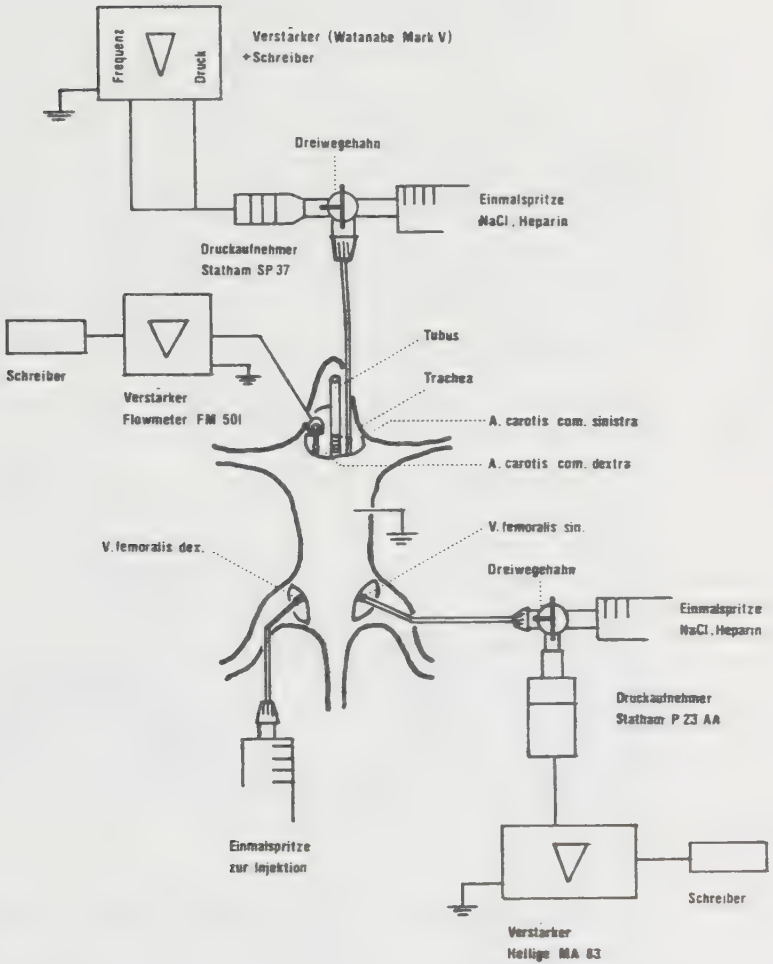


Abb. 4.2 Versuchsaufbau zur Messung von Carotisdruck, Carotisfluß und Venendruck an der Ratte

(s. Abb. 4.2) verbunden, der über eine Einmalspritze mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt wurde. Diese Spüllösung enthielt ca. 100 I.E./10 ml Heparin gegen ein Verlegen des Aufnehmers. Ansonsten wurde den Tieren, wegen der Gefahr der Interaktion mit den Diamidinen, kein Heparin verabreicht. Der Druckaufnehmer war mit einem Verstärker (Watanabe Schnellschreiber Mark V mit adaptiertem Meßbrücken-Koppler Typ 550 A und Herzfrequenz-Koppler der Fa. Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten) verbunden, der neben dem aktuellen Druck (systolisch und diastolisch) auch die aktuelle Herzfrequenz aufzeichnete. Die Schreibgeschwindigkeit betrug 2-50 mm pro Minute.

4.7.2 Blutige Messung des venösen Drucks

In die freipräparierte V. femoralis sin. (Methode s. Kap. 4.7.1) wurde ein PP 30-Schlauch, gefüllt mit 0,9% NaCl-Lösung/Heparin, eingeführt und vorsichtig bis zur Einmündung in die V. cava vorgeschoben. Verbunden war der Schlauch mit einem Statham P 23 AA Druckaufnehmer (Niederdruckaufnehmer). Über einen Dreiweghahn konnte der Aufnehmer mit der Spüllösung bestehend aus 0,9% NaCl-Lösung, versetzt mit Heparin, gefüllt werden (Abb. 4.2). Die aufgenommenen Drucksignale wurden über einen angeschlossenen Verstärker (Hellige MA 83) auf einem Schreiber (Linseis Flachsreiber) registriert.

4.7.3 Bestimmung der Flußrate durch induktive Messung

Der Carotisdurchfluß wurde mittels eines Carolina Electromagnetic Flowmeter, Modell FM 501 (Importeur: Fa. B. Schlag, Berg. Gladbach) gemessen. Über das Meßprinzip gibt Abb. 4.3 Auskunft. Um die freipräparierte A. carotis dextra herum wurde ein Meßkopf der Serie 100 angelegt (s. Abb. 4.4), in

welchem ein Mikroelektromagnet eingeschlossen ist. Dieser Magnet erzeugt ein kleines Magnetfeld, in dem das Gefäß liegt. Das zentrale Fe-Atom des Häm bildet dabei das magnetfeldverändernde Agens beim Durchfluß durch das Gefäß.

Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Durchfluß und Magnetfeldänderung.

Der angeschlossene Verstärker lieferte die Speisenspannung und registrierte die Veränderungen des Magnetfeldes. Diese wurden entweder als Mittel- oder Aktuellwerte in ml/Minute analog angezeigt, auf einem Schreiber aufgezeichnet und gegen einen Eichwert verglichen bzw. berechnet.

Die Meßstelle am Gefäß wurde mit physiologischer Kochsalzlösung stets feucht gehalten, um einen optimalen Kontakt zwischen Meßkopf und Gefäß zu gewährleisten.

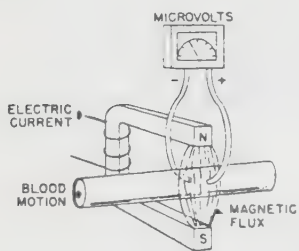


Abb. 4.3
Prinzip der induktiven
Flußmessung

Abb. 4.4
Meßköpfe für induk-
tive Flußmessung



4.8 Versuchsaufbau zur Messung der Hemmung noradrenalin-induzierter Kontraktionen an der Meerschweinchenaortenspirale

4.8.1 Präparation der Aortenspirale

Männliche oder weibliche Meerschweinchen von 400-700 g Körpergewicht wurden getötet und anschließend auf einem OP-Tisch fixiert. Nach Durchtrennung der Bauchhaut durch einen medialen Längsschnitt wurden die im Peritonealraum liegenden Organe, sowie nach Entfernung des Diaphragmas, lateraler Durchtrennung der Rippen, auch das Herz und die Lunge entfernt.

Die Aorta wurde in Höhe der Aufzweigung in die A. iliaca communis sinistra und - dextra, cranial in Höhe des Aortenbogens durchtrennt und in eine Petrischale mit Nährlösung gebracht, um Restblut zu entfernen.

Anschließend wurde das Gefäß in ein Präparationsgefäß (s. Abb. 4.7) überführt, welches mit 37° C warmer Nährlösung gefüllt war und mit Carbogen begast wurde.

Im Präparationsmedium wurden dann, nach Entfernung von Fett- und Bindegewebsresten am Blutgefäß, spiraling (s. Abb. 4.6) ca. 2 mm breite und 2-2,5 cm lange Streifen geschnitten.

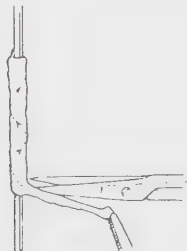


Abb. 4.6
Präparation der Aorten-
spirale

Zum Fixieren im Organbad wurde durch die beiden Enden jeweils ein speziell präparierter Haken gestochen, an dem sich entweder eine Fadenschleife oder ein freies Fadenstück befand (s. Abb. 4.8). Die Haken wurden aus chirurgischem Nahtmaterial hergestellt und waren extrem leicht.

4.8.2 Registrierung der Kontraktionen

Nach dem Präparieren der Aortenstreifen wurden diese in ein Organbad eingehängt (Organbad nach HOECHST, Fa. Hugo Sachs, Hugstetten, s. Abb. 4.8).

Alle Gefäßstücke wurden austariert und mit 1 g vorbelastet. Der erste Kontrollversuch mit Noradrenalin wurde nach einer Äquilibrierungszeit von mindestens einer Stunde aufgenommen.

Die Nährlösung wurde während dieser Zeit viertelstündlich gewechselt.

Die Registrierung der Kontraktionen erfolgte isotonisch durch Hebelaufnehmer (induktiv) und angeschlossenen Verstärkern (Hebelvorsatz, HF-Modem, Fa. Hugo Sachs, Hugstetten).

4.8.3 Nährlösung

Als Nährlösung wurde eine Krebs - Lösung verwendet, die folgende Zusammensetzung hatte (169):

NaCl	5,54 g/l
KCl	0,35 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,29 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,37 g/l
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l
NaHCO ₃	2,10 g/l
Glucose	2,10 g/l

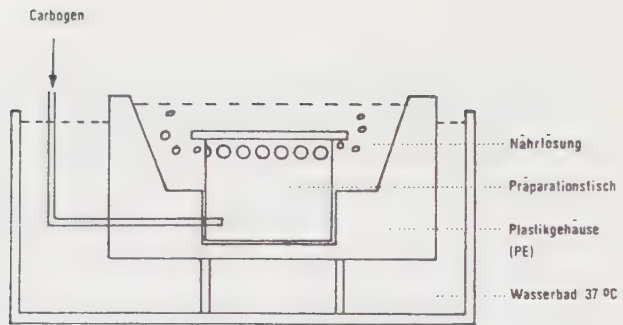


Abb. 4.7 Temperiertes Präparationsgefäß für Meerschweinenaortenspirale

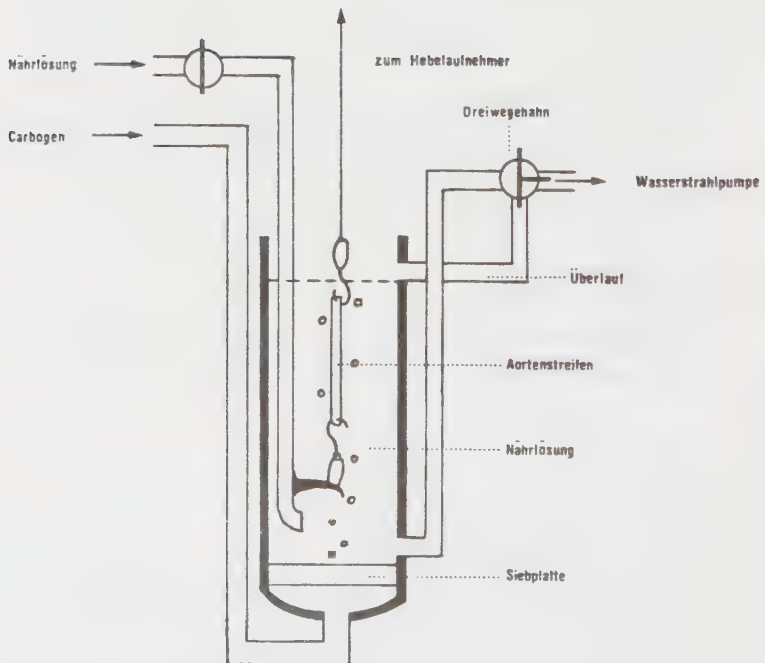


Abb. 4.8 Organbad (nach HOECHST) für Meerschweinenaortenspirale

Jedes Bad enthielt außerdem:

Propranolol	10^{-6} mol
Desipramin	10^{-8} mol
Tropolon	5×10^{-5} mol,

um β -Rezeptoren-Einflüsse (Propranolol) auszuschalten und um die Rückspeicherung (Desipramin) und die Catechol - O-Methyltransferase (COMT) (Tropolon) zu hemmen (82,212).

4.8.4 Versuchsablauf

Die einzelnen Blocker und Diamidine wurden jeweils genau 5 Minuten vor Versuchsbeginn der Badelösung zugesetzt. Die Kontroll- und Versuchskurven wurden mit Noradrenalinindosen von 10^{-9} bis 10^{-4} mol kumulativ aufgenommen.

Alle Noradrenalinlösungen enthielten 0,1 m Mol Ascorbinsäure als Oxidationsschutz.

Verdünnungen wurden stets mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Alle Reagenzien wurden vor dem Versuch frisch hergestellt.

4.9 Versuchsaufbau zur Messung der Mitochondrien- Atmung mit Rattenlebermitochondrien

4.9.1 Präparation der Rattenleber und Isolierung der Mitochondrien nach S c h n e i d e r (207)

4.9.1.1 Zusammensetzung des Präparationsmediums (PM)

Zur Präparation der Mitochondrien wurde ein Medium folgender Zusammensetzung benutzt:

250 m Mol	Saccharose	21,4 g/250 ml
10 m Mol	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	0,3 g/250 ml
0,1 m Mol	Ethylendiamintetra- essigsäure- Na_2 ($\text{EDTA}-\text{Na}_2$)	0,009 g/250 ml

in Aqua dest. gelöst und mit 2 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

4.9.1.2 Gewinnung der Rattenleber

Eine Ratte (250-350 g) wurde in Ethernarkose laparotomiert. Die Entnahme der Leber geschah prinzipiell nach der in 4.8.1 beschriebenen Weise.

Wegen der sehr kurzen Wirkungsdauer des Ethers mußte das Organ sehr schnell entfernt werden.

Die entnommene Leber wurde auf ein eisgekühltes Uhrglas gelegt und von Geweberesten gesäubert.

6 g des Restes wurden zur Gewinnung der Mitochondrien verwendet.

4.9.1.3 Mitochondrien-Isolierung

Die weiteren Arbeitsgänge wurden im Kühlraum durchgeführt. Mit einer Schere wurde das abgewogene Leberteil auf dem Uhrglas fein zerschnitten, anschließend in ein

Pottergefäß überführt, mit 30 ml Präparationsmedium übergossen und sofort homogenisiert (500 UpM).

Das Homogenat wurde in einen eisgekühlten Zentrifugeneinsatz gegossen und in einer Zentrifuge (Cryofuge 20-3) bei +4° C und 3500 UpM 5 Minuten zentrifugiert, um schwere Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand, der die Mitochondrien enthielt, wurde ein zweites Mal bei 12 000 UpM und +4° C 10 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand dekantiert und der Mitochondrien-Niederschlag in 1,8 ml Präparationsmedium resuspendiert. Diese Suspension war die eingesetzte Mitochondriensuspension. Sie war im Eis über mehrere Stunden haltbar.

4.9.2 Messung der Atmungsaktivität

4.9.2.1 Lösungen

Die gewonnene Mitochondriensuspension wurde in folgendem Medium inkubiert:

250	m Mol	Saccharose	8,55	g/100 ml
20	m Mol	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	0,243	g/100 ml
2,4	m Mol	$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	0,055	g/100 ml
0,04	m Mol	$Na_2(EDTA-Na_2)$	0,0015	g/100 ml

in Aqua dest. gelöst und mit 2 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

0,5 m Succinat-Lösung

2,95 g Bernsteinsäure wurden in 30 ml Aqua dest. gelöst, mit 10 m NaOH auf pH 7,2 eingestellt und mit Aqua dest. zu 50 ml ergänzt.

ADP-Lösung (Adenosin-5-Diphosphat)

94,20 mg ADP-Na₂ (MG: 471,2) wurden in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 2 N NH₃-Lösung auf pH 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde zu 1 ml portioniert und bis zum Verbrauch bei -20° C eingefroren.

4.9.2.2 Versuchsaufbau

Zur Messung des Sauerstoffverbrauches der Mitochondrien wurde eine Apparatur der Fa. Bachofer, Reutlingen, verwendet, bestehend aus 2 Sauerstoffelektroden (Typ Clark), Spannungsversorgung und 2 Schreibern (Servogor S, Fa. Metrawatt).

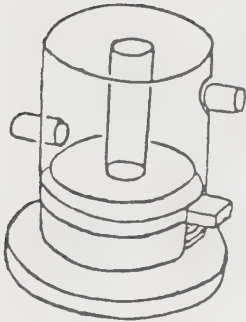
Die Sauerstoffelektrode besteht aus 2 Kammern (Abb. 4.9), dem Reaktionsraum, welcher den Puffer, die Mitochondrien-suspension, das Substrat und die ADP-Lösung aufnimmt und dem angekoppelten Meßraum, der darunter liegt.

Der Reaktionsraum wird durch einen Wassermantel auf 25° C thermostatisiert.

Der Meß- und Reaktionsraum sind durch eine, für Sauerstoff leicht permeable, Teflonmembran voneinander getrennt.

Die Messung erfolgt mittels einer Platinelektrode (Kathode) und einer Silberelektrode (Anode).

Die Elektroden bestehen aus dünnen Drähten und sind so in eine Plexiglasplatte eingegossen, daß sie durch eine gesättigte KCl-Lösung als Brücke miteinander verbunden sind (Abb. 4.10).



- 1 Reaktionskammer
- 2 Wassermantel, 25°C
- 3 Teflonmembran
- 4 KCl - Lösung
- 5 Silberanode
- 6 Platinkathode

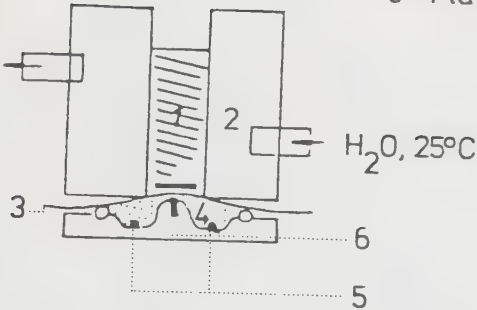


Abb. 4.9 Aufbau der verwendeten Sauerstoffelektrode
Fa. Bachofer

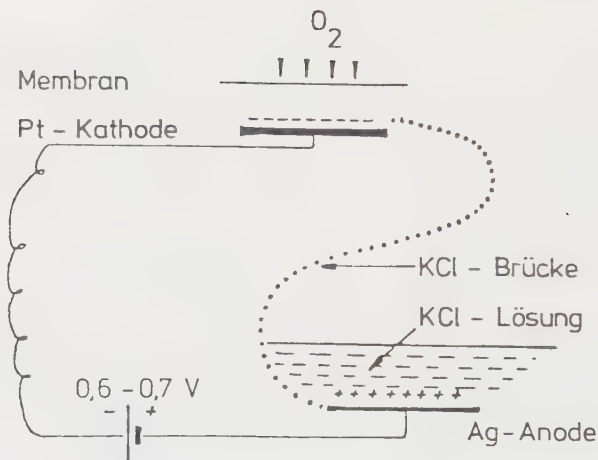
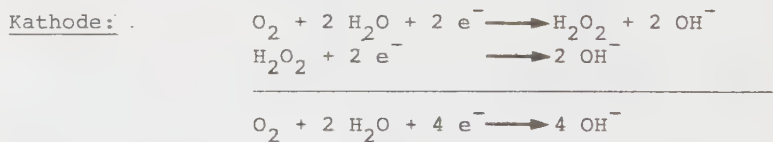
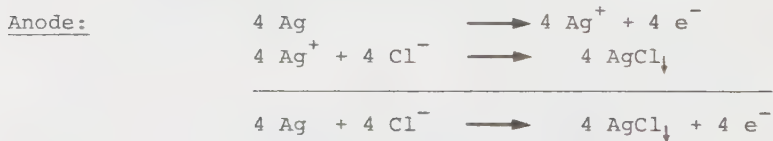


Abb. 4.10

Folgende Reaktionsabläufe ergeben sich für die



Um die Sauerstoffkonzentration in Kathodennähe stets konstant, d. h. der jeweiligen O_2 -Konzentration im Puffer entsprechend, zu halten, wird das Inkubationsgemisch stets von einem kleinen Rührmagneten (Flea) in Bewegung gehalten.

4.9.2.3 Eichung

Die Eichung des Schreibers wurde wie folgt durchgeführt:

1. Eichpunkt (Maximalwert) entspricht der im Inkubationsmedium gelösten Menge an Sauerstoff.

Diese Menge an physikalisch gelöstem Sauerstoff ist abhängig vom umgebenden Druck und der Temperatur.

Für 1012 m bar, 25° C ergibt sich ein O₂-Gehalt von 253 n Mol O₂/ml H₂O bzw. 1012 n Mol O/2 ml Ansatz.

2. Eichpunkt (Null-Wert)

Durch Reduktion des gesamten im Medium vorhandenen Sauerstoffes wird der Null-Punkt festgelegt.

Dies geschieht mit Dithionit.



4.9.2.4 Durchführung der Messung

In die Meßkammer wurden 2 ml Inkubationsmedium pipettiert und ausreichend lange gewartet, bis das Medium 25° C erreicht hatte.

Hierzu wurden 100 µl Mitochondriensuspension gegeben. Je nachdem, ob eine Kontroll- oder Hemmkurve aufgenommen wurde, erfolgte nach 1 Minute die Zugabe von Succinat oder des potentiellen Hemmstoffes. Anschließend wurde wie in Kap. 2.6.4.5 beschrieben verfahren.

Die Schreibergeschwindigkeit betrug 3 cm/Minute.

Gesamtansatz:

Inkubationsmedium	2000 μ l
Mitochondriensuspension	100 μ l
(Hemmstoff)	Var. ¹⁾
Succinatlösung, 0,5 m	20 μ l
ADP-Lösung (400 n Mol)	20 μ l
	2140 μ l

4.9.2.5 Berechnung

Die Berechnung der entsprechenden Parameter erfolgte nach graphischer Auswertung (Abb. 4.11, nach Fischer).

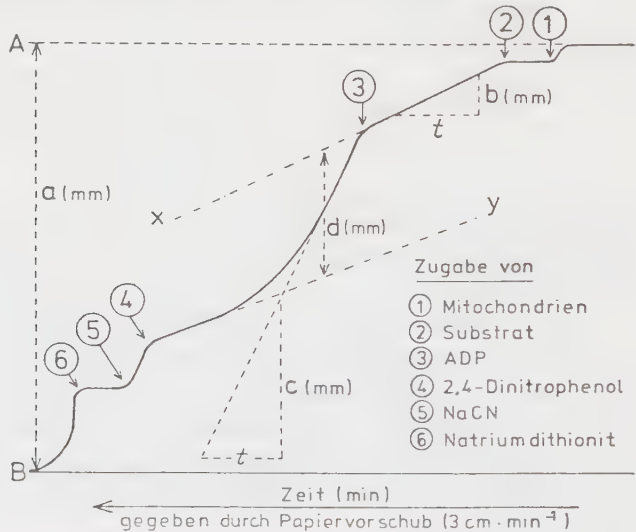


Abb. 4.11

¹⁾ Variationen in der zugesetzten Menge an Hemmstofflösung wurden bei der Berechnung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte pro Milliliter.

Demnach gilt:

O₂-Verbrauch im state 4

$$\text{Verbrauchsrate} = \frac{b \text{ [mm]} \times 1012 \text{ [n Mol O]}}{t \text{ [min]} \times a \text{ [mm]}}$$

O₂-Verbrauch im state 3

$$\text{Verbrauchsrate} = \frac{c \text{ [mm]} \times 1012 \text{ [n Mol O]}}{t \text{ [min]} \times a \text{ [mm]}}$$

RCR (Atmungskontrollquotient Q)

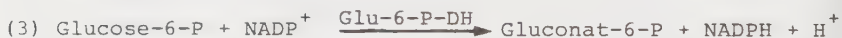
$$\text{RCR} = \frac{\text{Verbrauchsrate im state 3}}{\text{Verbrauchsrate im state 4}}$$

4.10 Versuchsaufbau zur Messung der Hemmeigenschaft der Diamidine gegenüber CK-HK/Glu-6-P-DH

Die Versuche wurden nach B e r g m e y e r (16)
durchgeführt.

4.10.1 Aktivitätsbestimmungen der CK

Testprinzip



CP = Creatinphosphat

CK = Creatin-Kinase

HK = Hexokinase

Glu-6-P-DH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

ADP = Adenosin-5-diphosphat

ATP = Adenosin-5-triphosphat

NADP⁺ = Nicotinadenindinucleotidphosphat

Reagenzien

I. Reaktionsgemisch

0,1 mol Triethanolaminhydrochlorid

22,0 m mol Glucose

11,0 m mol Mg²⁺

1,1 m mol ADP

11,0 m mol AMP

0,1 m mol NADP

II. Hexokinase / Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Suspension

Mischverhältnis 2:1 aus

Hexokinase (HK) : spez. Aktivität ≥ 140 U/mg

Glu-6-P-DH : spez. Aktivität ≥ 140 U/mg

in Ammoniumsulfat-Lösung 3,2 mol, pH 6,0

III. 0,27 mol Glutathion, reduziert

4,14 mg Glutathion wurden in 5 ml Aqua dest. gelöst

IV. Creatin-Kinase

($\approx$ ca. 380 U/mg Lyophilisat, 25° C)

Alle Enzyme wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Herstellung des Reaktionsgemisches

1850 mg Triethanolaminhydrochlorid

435 mg Glucosemonohydrat

235 mg Magnesiumacetat x 4 H₂O

46,9 mg ADP (freie Säure)

549 mg AMP x 6 H₂O

63 mg NADP

in ca. 70 ml H₂O lösen, pH-Wert mit 2 n NaOH auf pH = 7,0 einstellen und mit H₂O zu 100 ml ergänzen.

CP wurde in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

38 m mol CP x 4 H₂O (= 1,24 g) oder

25 m mol CP x 4 H₂O (= 0,82 g)

Das Reaktionsgemisch und die Glutathion-Lösung sind bei +4° C mindestens 4 Wochen stabil.

Verdünnung der CK

1 mg CK-Lyophilisat und 1 mg Rinderalbumin werden in 1 ml Triethanolaminpuffer (pH 7,5) gelöst

Diese Lösung wird mit Triethanolaminpuffer 1:100 verdünnt und so für den Meßansatz verwendet.

Alle Enzyme sollten bis zur Verwendung eiskühlt stehen.

Meßansatz

Meßstrahlung : 366 nm
Schichtdicke : 1 cm
Testvolumen : 1,36 ml
Testtemperatur : 25° C
Photometer : Zeiss PMQ II

Messung gegen Leerwert

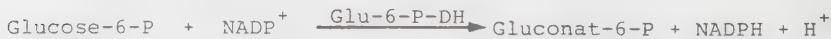
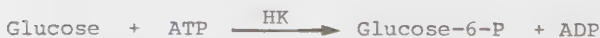
Zugesetzte Volumina der Hemmstoffe werden durch Puffervolumen ausgeglichen.

Reaktionsgemisch	1,25 ml
HK/Glu-6-P-DH-Suspension	10 µl
Glutathion-Lösung	50 µl
5 Minuten im Wasserbad auf 25° C temperieren	
Hemmstoff	Var. µl
CK	50 µl
Stoppuhr starten, nach 10 Minuten bis 15 Minuten Extinktion jede Minute ablesen, Mittelwert pro Minute bilden.	

4.10.2 Aktivitätsbestimmung der HK/Glu-6-P-DH

Aktivitätsmessungen dieses Enzymsystems wurden wie unter 4.10.1 beschrieben durchgeführt.

Testprinzip



Reagenzien

Das Reaktionsgemisch entsprach dem unter 4.10.1 beschriebenen, jedoch wurde kein CP zugesetzt. ADP wurde durch ATP äquimolar ersetzt.

Meßansatz

Meßstrahlung : 366 nm
 Schichtdicke : 1 cm
 Testvolumen : 1,31 ml
 Testtemperatur : 25° C
 Photometer : Zeiss PMQ II
 Messung gegen Leerwert

Reaktionsgemisch	1,25 ml
Glutathion-Lösung	50 µl
5 Minuten im Wasserbad auf 25° C temperieren	
Hemmstoff	Var. µl
E ₀ ablesen	
HK/Glu-6-P-DH	10 µl
Stoppuhr starten, nach 10 Minuten E ₁ ablesen, ΔE pro Minute berechnen	

4.10.3 Auswertung

Zur Bestimmung des Hemmtyps durch 2 verschiedene CP-Konzentrationen wurde $\frac{1}{\Delta E/\text{min}}$ gegen die Konzentration des Hemmstoffes im Ansatz aufgetragen [Dixon (62)]. Die Aktivität wurde in %-Restaktivität gegen einen Leerwert bestimmt.

4.11 Histologische Untersuchungen

4.11.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Bewertung der Fluoreszenz der beiden Verbindungen 102/198 und 192/188 an Paraffinschnitten des Mausfemur (Kap. 2.2) erfolgte durch Auflichtfluoreszenz.

Geräte

Mikroskop: Olympus BH 2 mit Fotoeinrichtung OM-2
Quecksilber Hochdruckbrenner
Anregungsfilter : IF 490 (blue exciter filter)
Sperrfilter : 0 530
Okular : 10 x
Objektiv : 20 x
Verlängerungs- : 1,25
faktor
Filmmaterial : Agfapan 25

4.11.2 Lichtmikroskopie

Die Beurteilung der Leber, Nieren, Herz und Gefäß-schnitte erfolgte mit dem gleichen Mikroskop im Durchlicht (Halogenlampe).
Vergrößerungen : 200 und 400-fach.

4.12 Färbereagenz nach Voigt ¹⁾

Diese Färbetechnik wurde von V o i g t zum Nachweis von Calcium vorgestellt (228).

Reagenz

N,N-1,8-Naphthylhydroxylamin-Na ²⁾

Zur Färbung wurden 500 mg pro 100 ml Aqua dest. gelöst,
Gegenfärbung mit Methylenblau-Lösung.

¹⁾ Frau K r a u t i n g e r vom Pathol. Inst. der Universität Erlangen-Nürnberg sei für die Erstellung der Schnitte und der Färbungen herzlich gedankt.

²⁾ Fa. Fluka, Neu Ulm

4.13 Statistik

Alle bei den enzymatischen Tests und den Blutdruckuntersuchungen erhaltenen Meßwerte wurden statistisch ausgewertet (174,185).

4.13.1 Mittelwerte

Der Mittelwert ist das arithmetische Mittel der Einzelmeßwerte x_i .

$$\bar{x} = \sqrt{\frac{\sum x_i}{N}}$$

$\bar{x}$ = Mittelwert

x_i = Einzelwert

N = Anzahl der Werte

4.13.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung als Maß der Streubreite ist wie folgt definiert:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i = Einzelwert

$\bar{x}$ = Mittelwert aller Ergebnisse

4.13.3 Standardabweichung des Mittelwertes

(S.E.M., Standard Error of the Mean)

S.E.M. als Maß der mittleren Abweichung vom Mittelwert ist wie folgt definiert:

$$S.E.M. = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

s = Standardabweichung der Versuchsreihe

n = Anzahl der Ergebnisse

4.13.4 Berechnung der Signifikanzen

Zur Überprüfung der Meßwerte auf signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe wurden der Student- t-Test oder die einfache Varianzanalyse herangezogen.

4.13.4.1 t-Test

t ist eine Zufallsvariable, die einer bestimmten mathematischen Verteilung folgt (t-Verteilung).

Aus der Verteilungsfunktion F (t) der Zufallsvariablen t folgen bestimmte Wahrscheinlichkeiten, die jeweils angeben, wie groß die Wahrscheinlichkeit p ist, Werte zu finden, die gleich oder kleiner als ein bestimmter kritischer Wert von t_0 sind.

Diese Werte sind für bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeiten aus Tabellen ablesbar.

Für die statistische Auswertung der Versuche wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

Hierbei gilt:

$$x_1, x_2, \dots, x_n \quad \text{und} \quad y_1, y_2, \dots, y_n$$

sind unabhängige Stichproben zweier normal verteilter Testreihen mit den unbekannten Mittelwerten μ_1 und μ_2 und der gleichen unbekannten Varianz σ^2 .

Für die Nullhypothese gilt:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = d \quad (\text{für } d=0 \text{ kein Unterschied})$$

Als Prüfgröße dient t.

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s^*} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$
$$\text{mit } s^* = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der 1. Testreihe
 $\bar{y}$ = arithmetisches Mittel der 2. Testreihe
 n_1 = Anzahl der Ergebnisse der 1. Testreihe
 n_2 = Anzahl der Ergebnisse der 2. Testreihe
 s_1/s_2 = Standardabweichung der 1. bzw. der 2. Testreihe.

Das Signifikanzniveau p wird durch den Vergleich der Prüfweite "t" mit den Tabellenwerten für den entsprechenden Freiheitsgrad bestimmt.

Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ angenommen, d. h. die Wahrscheinlichkeit, eine falsche Aussage zu treffen, "Irrtumswahrscheinlichkeit", beträgt 5%.

4.13.4.2 Einfache Varianzanalyse

Als Prüfgröße der Varianzanalyse dient die Zufallsvariable F (F -Verteilung).

Unterschiedlich zum t -Test können mit der Varianzanalyse statt paarig (un-) verbundener Meßreihen, n Meßreihen auf die Nullhypothese getestet werden.

Auch hier werden die erhaltenen F -Werte mit den entsprechenden Freiheitsgraden in Tabellen auf entsprechende Signifikanzniveaus überprüft.

Die Varianzanalyse bietet den Vorteil, in einem $K o l l e k -$
 $t i v$ von Meßreihen signifikante Veränderungen zu erkennen.

Da bei den vorliegenden Untersuchungen nur jeweils zwei Meßreihen miteinander verglichen wurden, waren die beiden Berechnungsverfahren gegeneinander austauschbar und lieferten bei der Überprüfung der Signifikanzen der einen mit der anderen Methode identische Ergebnisse.

4.13.5 Berechnung einer Regressionsgeraden nach S c h i l d (222)

Die Auswertung von Dosis-Wirkungs-Kurven, wie sie z. B. bei Kontraktionsversuchen mit der Aortenspirale erhalten werden, erfolgt zunächst graphisch in der Art, daß man

log-Dosis gegen %-Effekt aufträgt.

Normalerweise tritt bei einer kompetitiv-antagonistischen Aktivität eines zugesetzten Stoffes eine parallele Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ein (Abb. 4.12).

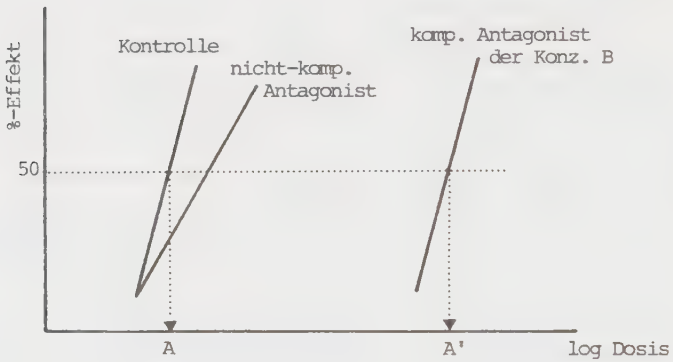


Abb. 4.12

Ein nicht-kompetitiver Antagonismus äußert sich nicht in einer parallelen Rechtsverschiebung der Kurven, sondern in einer verminderten Steigung der Regressionsgeraden mit gleichzeitig reduziertem Maximaleffekt.

Bei der Erstellung der pA_2 -Werte eines kompetitiven Antagonisten nach Schild geht man wie folgt vor:

1. Es werden die Kontroll-Kurve und die Dosis-Wirkungs-Kurve nach Vorbehandlung mit Substanz X der Konzentration B graphisch angetragen (s. Abb. 4.12).
2. Die Schnittpunkte einer parallelen Geraden zur x-Achse durch die beiden Kurven beim 50%-Effekt sollten die Konzentrationen A bzw. A' sein.

3. In einer weiteren Graphik (Abb. 4.13) trägt man $\log \left(\frac{A'}{A} - 1 \right)$ gegen $-\log [B]$ auf, wobei B die eingesetzte Konzentration des Antagonisten ist.

In der Regel erhält man so eine nahezu lineare Punktverteilung, durch die man eine zu berechnende Gerade legen kann. Diese Gerade schneidet die x-Achse im gesuchten pA_2 -Wert.

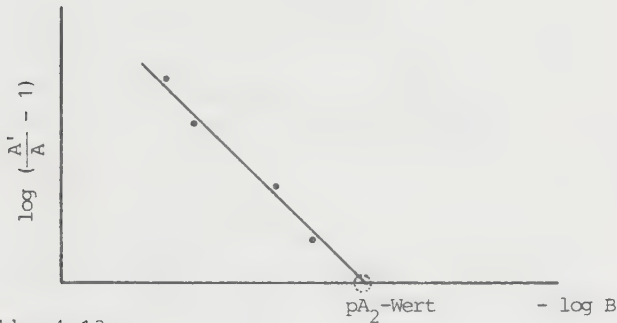


Abb. 4.13

Die gebräuchliche Methode zur Berechnung dieser Geraden ist die der kleinsten Abweichungsquadrate, d. h. die Gerade wird rechnerisch so gelegt, daß die kleinsten Abstände der Meßpunkte zur Geraden einem Minimum zustreben (222).

C) A N H A N G

A.I Untersuchungen am Auge

A.1 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Diimidazolino- Verbindungen als Miotika

Wie bereits erwähnt, sind Diimidazolin-Verbindungen vom Typ des 192/188 zum Teil starke Hemmer der ACH-Esterase. S c h ü r g e r (209) und H a r b a u m - N e u h a u s (105) haben diesen Effekt näher untersucht.

Der Gedanke, diese Nebenwirkung zur Hauptwirkung im Sinne einer miotisch wirksamen, und daher eventuell in der Glaukomtherapie einsetzbar zu machen, lag nahe, nicht zuletzt deshalb, weil bereits andere ACH-Esterase-Hemmer mit biskationischer Struktur, wie z. B.

D e m e c a r i u m und D i s t i g m i n (s. Abb. A.1.1) in der Glaukomtherapie eingesetzt werden.

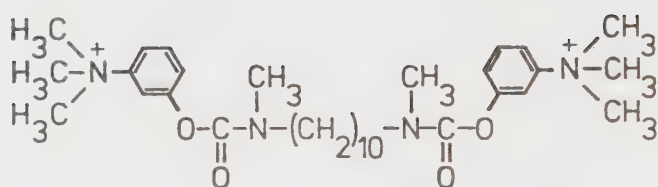
Um die Möglichkeiten einer solchen Therapie abschätzen zu können, wurde für die Versuche zur eventuellen Senkung des Augeninnendruckes durch Diimidazoline 253/156 ausgewählt, ein starker ACH-Esterase-Inhibitor ($K_I = 2 \times 10^{-8}$ M/l) (210).

Als Kontrolle sollte Physostigminsalicylat verwendet werden.

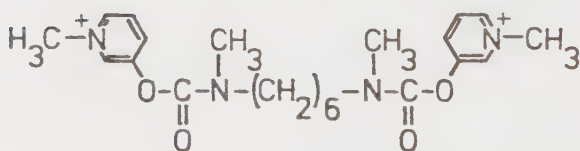
A.1.1 Vorversuch

In einem Vorversuch wurde zum Nachweis der Resorption der Substanzen einem Kaninchen auf ein Auge $3 \times 5 \mu\text{l}$ (jeweils 10 Minuten Zwischenzeit) einer 1%-igen (berechnet auf Base) Lösung von 253/156 mittels einer Mikropipette (Transferpettor, Fa. Braun, 0 - $10 \mu\text{l}$) lokal aufgetragen. Anschließend wurde die Pupillengröße als Indikator für die Resorption der Substanz überprüft.

Das behandelte Auge zeigte gegenüber dem unbehandelten einen kleineren Pupillendurchmesser.



Demecarium



Distigmin

Die Hell-Dunkel-Adaption war beeinträchtigt. Beide Effekte entsprechen der erwarteten parasympathomimetischen Wirkung, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß eine Resorption stattgefunden hatte.

A.1.2 Messung des Augeninnendruckes ¹⁾

A.1.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten von 250-400 g Körpergewicht ausgewählt, da die meisten anderen Versuche ebenfalls an Ratten durchgeführt wurden.

A.1.2.2 Methode

Die Tiere wurden mittels Urethanlösung (20%, 1,3 g/kg KG) narkotisiert.

Die Messung des Augeninnendruckes erfolgte manometrisch (56) mittels einer Kanüle (Nr. 20), die unter dem OP-Mikroskop in die vordere Augenkammer (s. Abb. A.1.2) eingeführt wurde. Gemessen wurde über einen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten PP 20-Schlauch mittels eines Statham SP 37 Aufnehmers, sowohl der aktuelle Druck p_a , als auch der mittlere Augeninnendruck $\bar{p}$.

Als Verstärker diente ein Hellige Elektromanometer MA 83 mit angeschlossenem Linseis Flachsreiber.

Schreibervorschub: 10 mm/Minute; 100 mm/Stunde.

Die Substanz wurde auch bei den Ratten lokal appliziert. Sie erhielten jeweils 2-3 Minuten nach der Katheterisierung der Kammer 2-4 x (jeweils im Abstand von 5 Minuten)

1) Für die Einweisung in die Problematik der Druckmessung am Auge danke ich Herrn Dr. R. Funk, Anatomisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg.

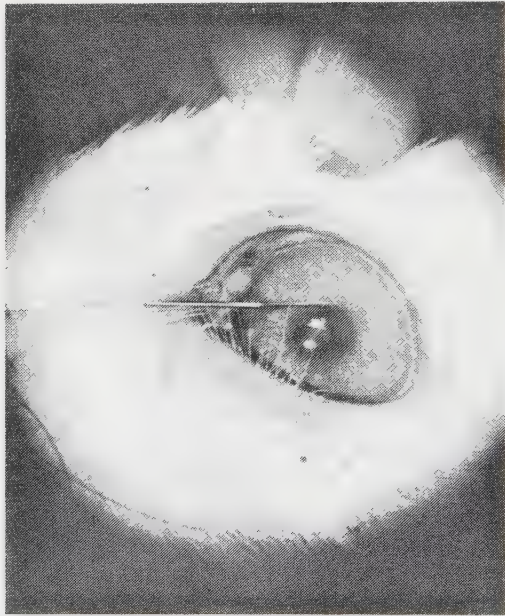


Abb. A.1.2 Messung des Augeninnendruckes durch eine
in die vordere Augenkammer eingeführte
Kanüle mit angeschlossenem Druckaufnehmer

1 μ l einer 1%-igen Lösung von 253/156 oder Physostigmin auf das Auge aufgetropft.

Der Druckverlauf wurde bis zu einer Stunde registriert.

A.1.2.3 Herstellung der Lösungen

Die Substanzen wurden auf der Analysenwaage abgewogen, ebenso das Lösungsmittel (Aqua ex amp. puriss.). Um zusätzliche Reizungen am Auge zu vermeiden, wurden die Lösungen isotonisiert. Als Zusatz zur Isotonisierung wurde NaCl p. a. verwendet.

Die Isotonisierung wurde nach (58) folgendermaßen durchgeführt:

$$\% \text{ HS} = \frac{0,52 - n (T_A)}{\Delta T_H}$$

0,52 = Gefrierpunktserniedrigung der Tränenflüssigkeit gegenüber H_2O in $^{\circ}\text{C}$.

n = Gehalt der Lösungen des Wirkstoffes in Prozent

ΔT_A = Gefrierpunktserniedrigung einer 1%-igen Lösung des Wirkstoffes gegenüber reinem Wasser in $^{\circ}\text{C}$.

ΔT_H = Gefrierpunktserniedrigung einer 1%-igen Lösung des Hilfsstoffes (NaCl) gegenüber Wasser in $^{\circ}\text{C}$.

War T_A nicht literaturbekannt, was für 253/156 zutraf, wurde ΔT_A nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta T_A = \frac{16,95}{\text{Äquivalentgewicht}}$$

$$\text{Äquivalentgewicht} = \frac{\text{Molekulargewicht}}{2}$$

A.1.3 Ergebnisse

Die Versuche zur Messung des Druckes mittels einer in die vordere Augenkammer eingeführten Kanüle und Druckaufnehmer erbrachten keine Unterschiede zum Ausgangsdruck. Trotz maximaler Verengung der Pupille zeigten sich nach Aufbringen der Substanzen (Physo-stigmin, 253/156) keine signifikanten Veränderungen am Augeninnendruck (s. Abb. A.1.3 und A.1.4). Dieser zunächst überraschende Befund kann jedoch wie folgt interpretiert werden:

Eine maximale Pupillenverengung durch Erregung des M. sphinkter pupillae allein muß noch nicht notwendigerweise den Augeninnendruck senken.

Für die Glaukomtherapie ist dies eher eine störende Nebenwirkung (208).

Für die drucksenkende Wirkung kommen andere Mechanismen in Frage, z. B. eine Wirkung auf die motorische Endplatte des M. ciliaris, wodurch es zur Kontraktion des Muskels kommt und damit zur Öffnung der Poren des Trabekelmaschenwerkes.

Dadurch wird der Abfluß des Kammerwassers durch den Schlemm'schen Kanal erleichtert (143).

Bei der Ratte, die eine relativ große, starre Linse besitzt, ist eine analoge Wirkung nicht möglich, so daß Acetylcholinesterasehemmer nicht in gleichem Maße drucksenkend wirksam werden können wie beim höheren Vertebraten (66).

Zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet müßten daher andere Modelle herangezogen werden (Affe). Solche standen im Institut nicht zur Verfügung, so daß entsprechende Versuche nicht durchgeführt werden konnten.

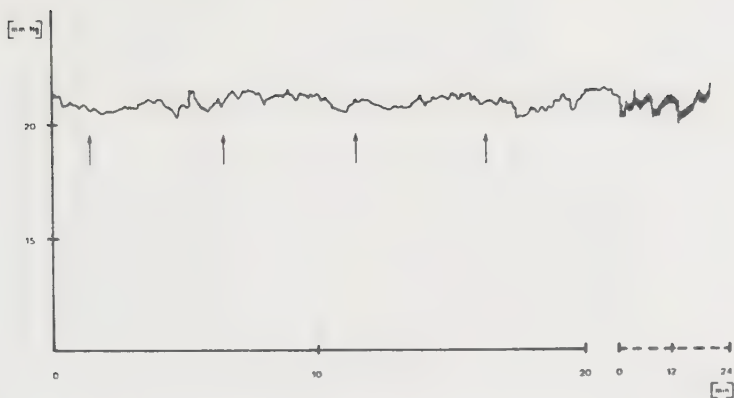


Abb. A.1.3 Augeninnendruck der Ratte nach 253/156, 1%-ige Lösung; Pfeile ($\uparrow$) zeigen Zeitpunkt der lokalen Applikation von 1 μ l

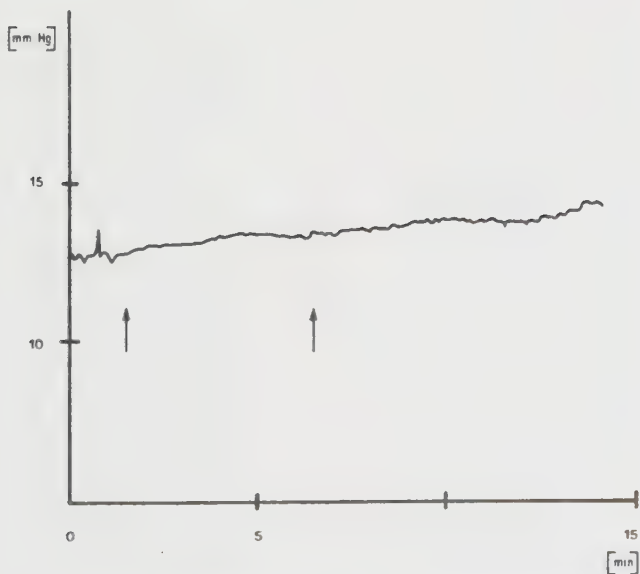


Abb. A.1.4 Augeninnendruck der Ratte nach Physostigminsalicylat, 1%-ige Lösung; Pfeile ($\uparrow$) zeigen Zeitpunkt der lokalen Applikation von 1 μ l

A.II Tabellen / Graphiken

mg/kg KG	10	15	20	25	30	40	50	60	LD ₅₀ mg/kg
Pentamidin	6/0	6/1	6/0	6/1	6/4	6/6			27,1
102 / 198			6/0		6/1		6/4	6/6	41,7
192 / 188			6/0		6/1	6/2	6/4	6/6	42,7

i.v. LD₅₀ Bestimmung

erste Zahl = Anzahl der Versuchstiere
zweite Zahl = Anzahl der gestorbenen Tiere
Konzentration berechnet auf mg Base / kg KG

mg/kg KG	30	70	100	130	LD ₅₀ mg/kg
192 / 188	8/0	8/2	8/7	8/8	79,6

i.p. LD₅₀ Bestimmung

Abb. A.2.1 Bestimmung der LD₅₀ verschiedener trypanocider Diamidine nach i. v.-
und i. p.-Applikation

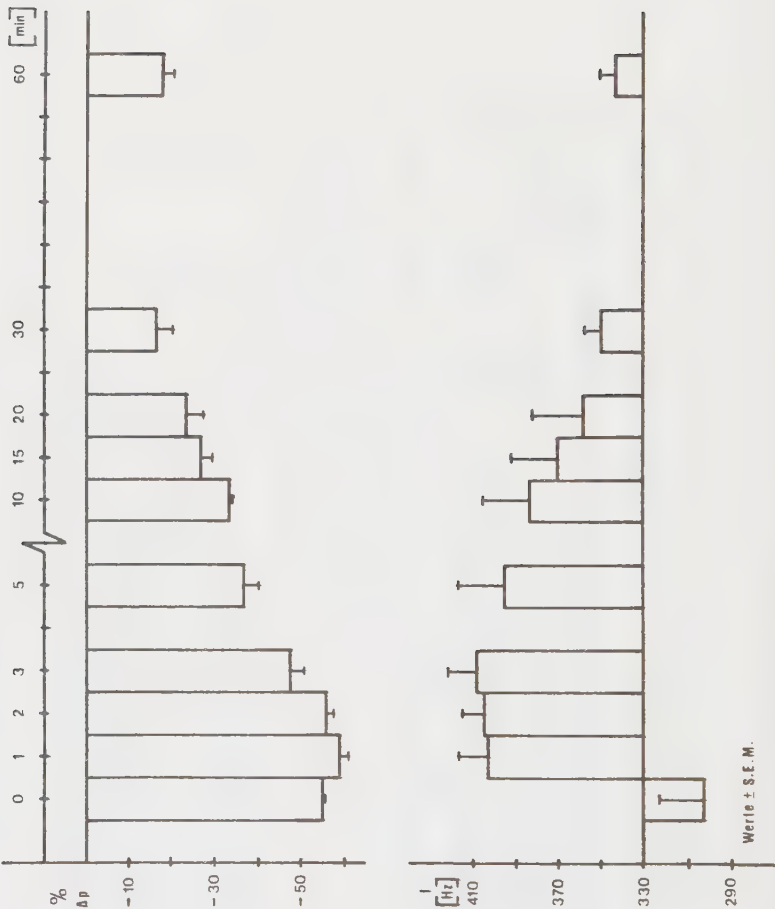


Abb. A.2.2 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diamidines;
Vorbehandlung mit Nor-
adrenalin

102/198
2 mg/kg i.v.
+ NA 100 µg/kg s.c.

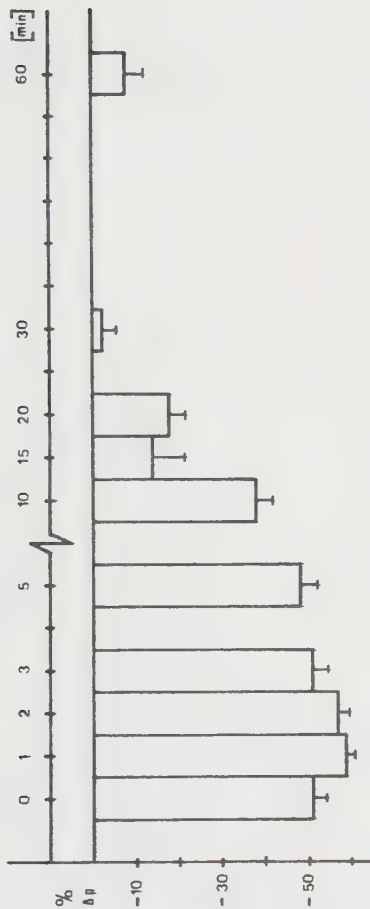
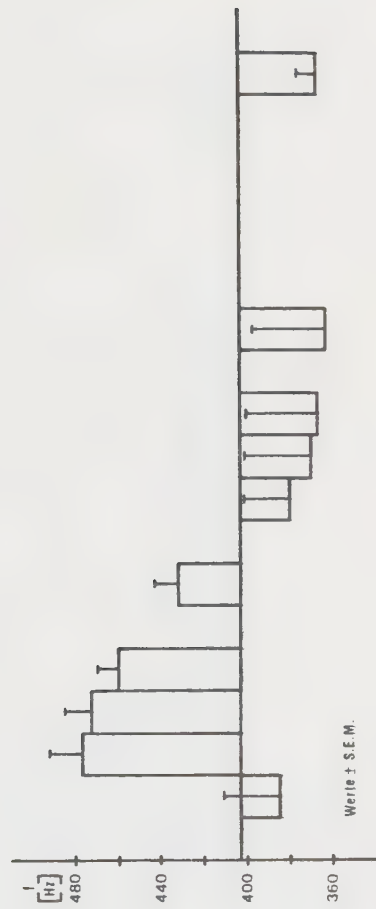


Abb. A.2.3 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diimidazo-
lines;
Vorbehandlung mit Nor-
adrenalin



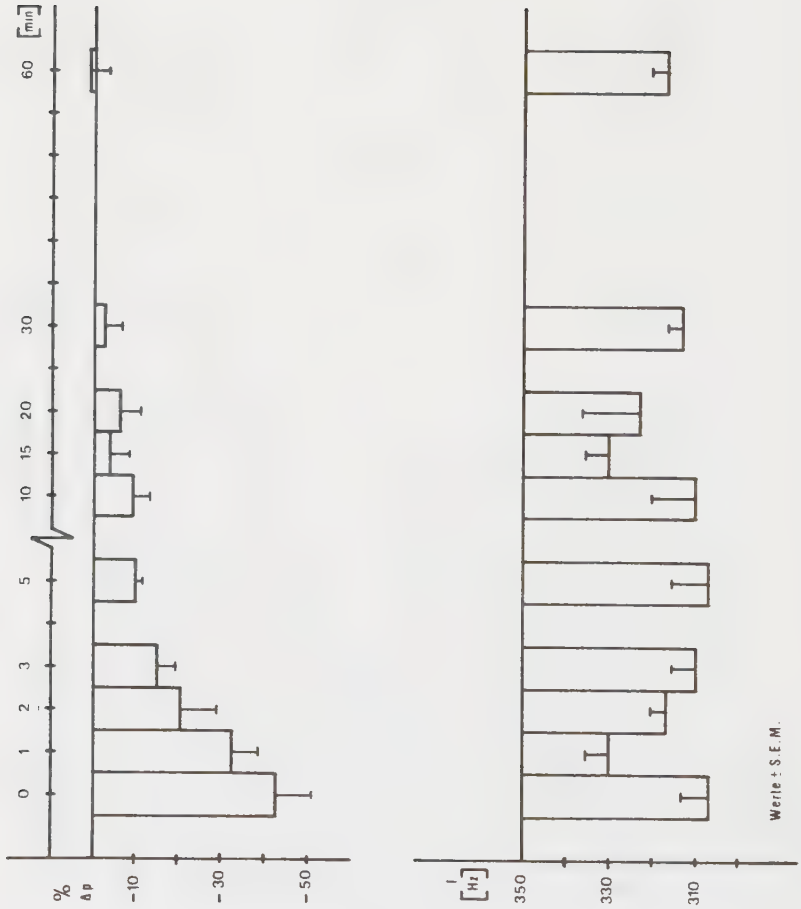
192/188

2 mg/kg i.v.

+ NA 100 µg/kg s.c.

Werte ± S.E.M.

Abb. A.2.4 Screeningversuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diimidazo-
lines;
Vorbehandlung mit Nor-
adrenalin



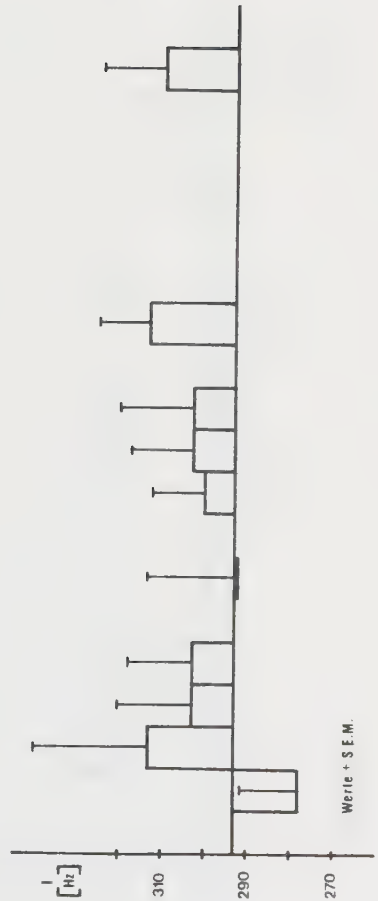
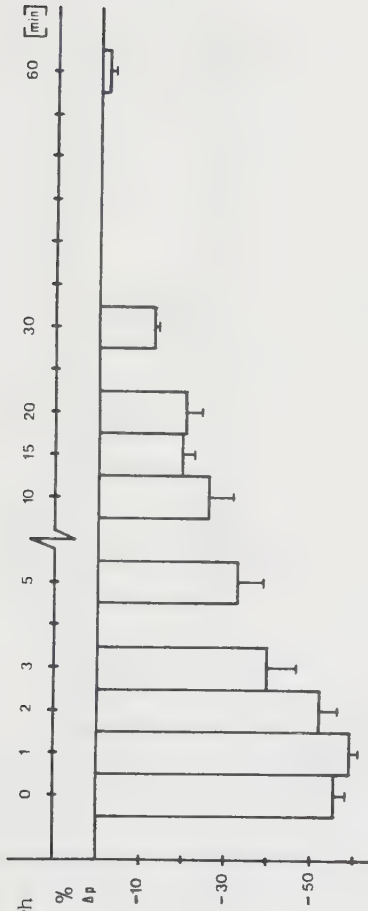
253/156
2 mg/kg i.v.

+ NA 100 µg/kg s.c

Abb. A.2.5 Screeningversuch

Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Dimidazo-
lines;

Vorbehandlung mit Anti-
histaminika



192/188

2 mg/kg i.v.

+ Mepyramin 10 mg/kg i.p.
Cimetidin 10 mg/kg i.v.

Werte ± S.E.M.

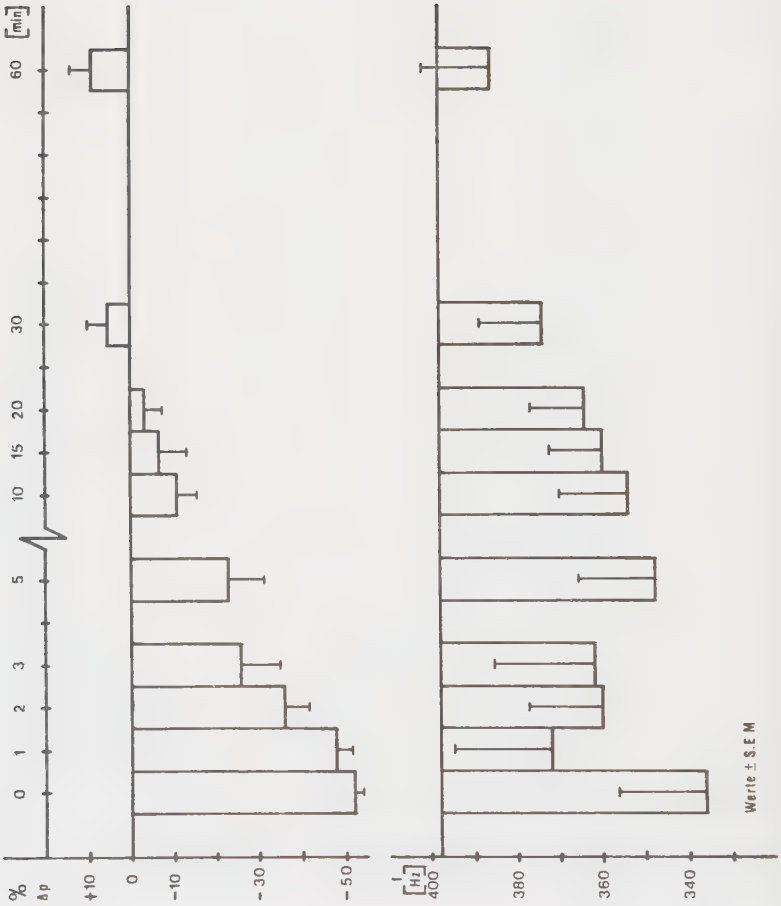


Abb. A.2.6 Screening-
versuch

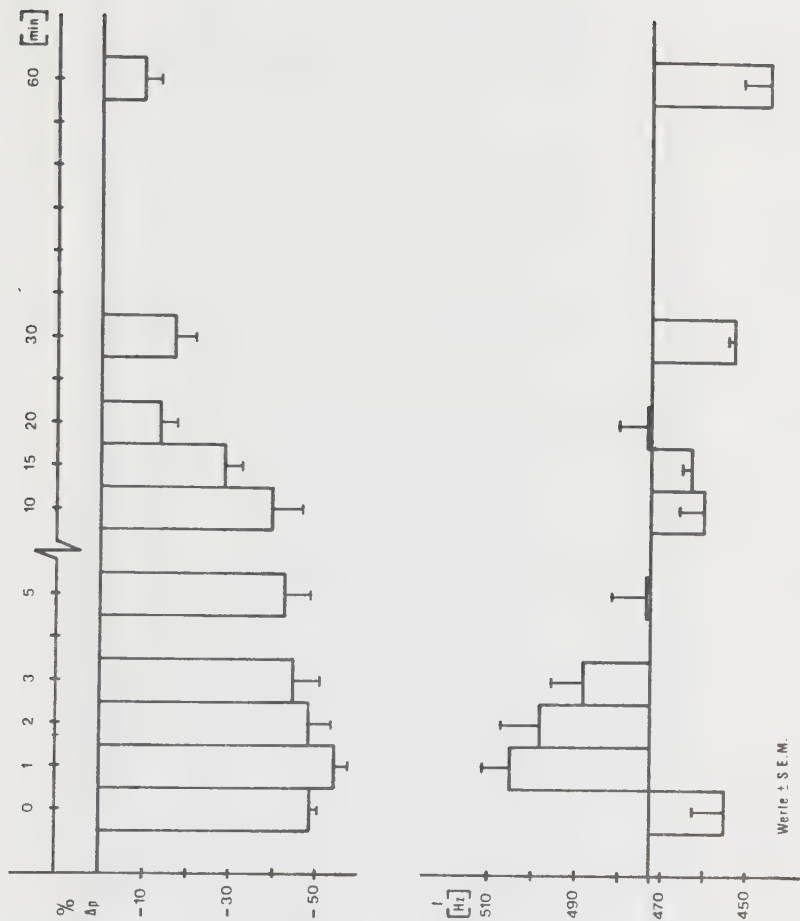
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diimidazo-
lines;
Vorbehandlung mit Anti-
histaminika

253/156
2 mg/kg i.v.

+ Mepyramin 10 mg/kg i.p.
Cimetidin 10 mg/kg i.v.

Werte ± S.E.M.

Abb. A.2.7 Screening-
versuch
Blutdruck (p) und Herz-
frequenz (f) nach Appli-
kation eines Diamidines;
Vorbehandlung mit Di-
natriumergonoglycat (DSCG)



102/198

2 mg/kg i.v.

+ DSCG 100 mg/kg i.p.

Pentamidin S-GOT

h	10 mg / kg			Kontrolle			df	Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.		p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	80,8	15,9	5,03	75,0	7,7	2,44	18			
1	107,7	22,9	7,63	96,9	17,9	6,0	16			
2	92,9	19,0	6,0	89,9	14,5	5,5	15			
4	88,5	14,8	4,7	93,8	10,1	3,4	17			
8	57,3	10,1	3,2	58,0	11,0	3,7	17			
24	65,1	15,3	5,1	68,8	17,5	5,54	17			
48	72,5	13,3	4,2	73,9	5,9	1,9	18			
72	91,0	15,3	5,4	80,6	14,2	4,5	16			

Tab. A.2.8 S-GOT-Werte der Maus nach PENTAMIDIN-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

Pentamidin S-GOT

h	30 mg / kg			Kontrolle			Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df
0,5	92,7	33,1	10,5	83,7	16,3	5,2	9,0	0,77	18
1	69,2	18,6	6,2	79,2	12,2	3,9	- 10,0	- 1,41	17
2	93,9	21,0	4,7	83,5	17,0	4,1	10,4	1,62	35
4	97,2	19,0	6,7	70,3	10,8	3,4	26,9	3,78	16
8	167,9	36,5	12,9	90,5	19,9	6,3	77,4	5,74	16
24	103,6	16,7	5,6	85,2	13,0	4,1	18,4	2,71	17
48	67,3	13,7	4,3	67,6	14,4	4,6	- 0,3	- 0,05	18
72	59,2	10,8	3,4	70,4	13,0	4,1	- 11,2	- 2,09	18

Tab. A.2.9 S-GOT-Werte der Maus nach PENTAMININ-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-t-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

102 / 198 S-GUT

h	10 mg / kg			Kontrolle			Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df
0,5	75,0	12,9	3,0	69,9	13,9	3,3	5,1	1,17	35
1	89,2	13,9	4,9	76,6	11,6	4,1	12,6	1,97	14
2	92,3	20,5	6,8	85,0	14,9	4,7	7,3	1,26	17
4	116,2	27,3	9,1	73,0	11,5	3,8	43,2	4,38	16
8	102,1	26,7	8,4	74,3	21,0	6,6	27,8	2,59	18
24	129,8	37,6	13,3	87,4	26,1	9,3	42,4	2,62	14
48	67,6	28,2	10,0	72,4	13,8	4,9	- 4,8	- 0,43	14
72	44,7	5,2	1,7	59,6	14,2	4,7	-14,9	- 2,95	16

Tab. A.2.10 S-GUT-Werte der Maus nach 102/198-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;

t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

h	30 mg / kg			Kontrolle			Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df
0,5	96,7	17,5	5,8	69,8	8,4	2,7	26,9	3,68	17
1	102,7	16,4	5,5	76,9	13,0	4,3	25,8	3,70	16
2	247,9	68,1	16,5	99,2	18,2	1,9	148,7	8,94	33
4	197,3	82,0	21,2	101,4	17,0	4,4	95,9	4,61	28
8	342,2	90,6	30,2	90,7	15,6	4,9	251,5	8,66	17
24	129,0	18,25	5,8	82,9	14,9	4,7	46,0	6,18	18
48	66,9	17,0	5,4	69,5	16,3	5,2	- 2,6	- 0,35	18
72	60,6	14,2	4,5	66,4	17,7	5,6	- 5,8	- 0,81	18

Tab. A.2.11 S-GOT-Wert der Maus nach 102/198-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

192 / 188 S-GOT

h	10 mg / kg			Kontrolle						Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df	p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	72,4	14,8	4,93	69,8	11,8	3,7	2,6	0,43	17			
1	94,3	25,5	8,1	86,2	13,8	4,6	8,1	0,84	17			
2	92,6	20,7	6,6	86,2	18,7	6,2	6,4	0,7	17			
4	107,9	22,1	7,0	79,1	11,1	3,5	28,8	3,7	18		x	
8	74,7	9,9	3,1	63,7	13,6	4,3	11,0	1,88	18			
24	68,7	12,9	4,1	67,5	10,8	3,4	1,2	0,24	18			
48	104,9	19,8	6,3	71,5	10,3	3,3	33,4	4,72	18			x
72	82,0	16,7	5,3	72,0	13,6	4,5	10,0	1,41	17			

Tab. A.2.12 S-GOT-Wert der Maus nach 192/188-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

192 / 188 S-GOT

h	30 mg / kg			Kontrolle							Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	A	t	df		p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	105,1	33,2	7,43	81,2	13,7	3,1	23,9	2,97	38		x		
1	85,6	23,2	7,3	83,0	15,3	5,1	2,6	0,1	18				
2	149,3	39,1	13,8	79,3	16,4	5,2	70,0	5,15	16				x
4	313,3	54,6	19,3	119,4	30,2	9,6	193,9	9,59	16				x
8	175,7	36,1	12,0	128,8	38,9	12,3	46,9	2,74	17		x		
24	122,2	32,9	10,4	98,1	18,4	5,8	24,1	2,02	18				
48	54,8	7,1	2,4	66,0	16,8	5,3	- 11,2	- 1,86	17				
72	66,9	18,0	6,4	65,7	10,6	3,4	1,2	0,18	16				

Abb. A.2.13 S-GOT-Wert der Maus nach 192/188-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; A = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;

t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

Pentamidin Glucose

h	10 mg / kg			Kontrolle			Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df
0,5	118,4	20,9	6,6	120,5	19,9	6,3	- 2,1	- 0,23	18
1	147,0	21,9	7,3	160,4	19,3	6,1	- 13,4	- 1,42	17
2	149,5	12,8	4,1	157,7	9,7	3,1	- 8,2	- 1,61	18
4	115,9	15,8	5,0	126,6	8,8	2,8	- 10,7	- 1,87	18
8	115,2	15,4	4,9	112,6	11,3	3,6	2,6	0,42	18
24	123,5	17,6	5,6	109,0	15,1	4,8	14,5	1,97	18
48	99,5	18,1	5,7	103,9	12,7	4,0	- 4,4	- 0,63	18
72	133,7	23,0	7,7	121,1	10,6	3,4	12,8	1,59	17

Tab. A.2.14 Blutglucose-Werte der Maus nach PENTAMIDIN-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

Pentamidin Glucose

h	30 mg / kg				Kontrolle				Signifikaz			
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df	p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	162,7	22,1	7,0	160,2	11,0	3,7	2,5	0,3	17			
1	152,4	27,9	9,3	134,6	19,6	6,2	17,8	1,63	17			
2	137,4	18,2	4,42	112,1	16,9	4,1	25,3	4,20	32			x
4	120,2	18,7	6,2	125,9	17,7	5,6	- 5,7	- 0,45	17			
8	133,1	18,2	6,1	139,3	14,7	4,7	- 6,2	- 1,11	17			
24	127,3	12,9	4,1	111,2	22,7	7,2	16,1	1,95	18			
48	121,6	10,6	3,4	123,9	11,5	3,6	- 2,3	- 0,45	18			
72	139,7	29,2	9,2	144,2	27,5	9,2	- 4,5	- 0,01	17			

Tab. A. 2.15 Blutglucose-Wert der Maus nach PENTAMIDIN-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

102 / 198 Glucose

h	10 mg / kg			Kontrolle						Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df	p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	136,5	20,9	4,9	128,0	20,2	4,8	8,5	1,24	34			
1	154,8	18,4	5,8	135,2	27,3	8,6	19,6	1,88	18			
2	152,9	28,6	9,1	125,7	17,4	5,5	27,2	2,57	18	x		
4	121,3	16,4	5,2	110,6	23,8	7,5	10,7	1,17	18			
8	116,0	27,1	8,6	128,5	12,0	3,8	- 12,5	- 1,32	18			
24	133,1	21,4	6,8	134,6	22,3	7,1	- 1,5	- 0,16	18			
48	108,6	18,4	5,8	116,2	13,9	4,6	- 7,6	- 1,0	17			
72	110,0	10,9	3,6	120,1	17,5	5,5	- 10,1	- 1,49	17			

Tab. A.2.16 Blutglucose-Wert der Maus nach 102/198-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

102 / 198 Glucose

h	30 mg / kg			Kontrolle						Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df	p<0,05	p<0,01	p<0,001
0,5	175,0	22,3	7,1	162,4	21,5	6,8	12,6	1,28	18			
1	186,5	25,3	8,0	154,6	15,4	4,9	31,9	3,41	18		x	
2	199,7	44,9	10,0	134,4	19,7	4,4	65,3	5,96	38			x
4	118,0	28,9	6,5	130,2	14,2	3,3	- 12,2	- 1,66	37			
8	98,0	24,8	7,9	126,2	13,4	4,2	- 28,2	- 3,16	18		x	
24	110,8	29,0	9,2	132,5	25,4	8,0	- 21,7	- 1,78	18			
48	111,7	20,4	6,5	123,9	15,9	5,0	- 12,2	- 1,49	18			
72	141,2	16,9	5,4	144,6	14,6	4,6	- 3,4	- 0,48	18			

Tab. A.2.17 Blutglucose-Wert der Maus nach 102/198-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;

t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

h	10 mg / kg			Kontrolle			Signifikanz		
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df
0,5	152,1	20,8	6,9	135,2	16,8	5,3	16,9	2,0	17
1	151,2	18,4	6,1	159,4	11,6	3,9	- 8,2	- 1,13	16
2	157,5	12,5	4,4	150,2	17,5	5,5	7,3	0,99	16
4	115,6	19,4	6,1	132,3	15,5	5,2	- 16,7	- 2,06	17
8	123,5	22,9	7,3	118,6	14,1	4,5	4,9	0,57	18
24	113,9	14,2	4,5	113,8	12,6	4,0	0,1	0,01	18
48	116,1	13,9	4,4	119,3	7,7	2,4	- 3,2	- 0,64	18
72	127,0	18,9	6,0	123,2	11,4	3,6	3,8	0,54	18

Tab. A.2.18 Blutglucose-Wert der Maus nach 192/188-Behandlung mit 10 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;
t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

192 / 188 Glucose

	30 mg / kg				Kontrolle				Signifikanz			
	X	SD	S.E.M.	X	SD	S.E.M.	Δ	t	df	p<0,05	p<0,01	p<0,001
h												
0,5	187,5	23,2	5,2	157,7	13,2	3,2	29,8	4,7	35			x
1	205,6	54,1	17,1	143,0	20,7	6,6	62,6	3,4	18		x	
2	159,7	24,2	5,7	124,3	12,3	2,9	35,4	5,51	34			x
4	118,1	14,8	4,7	139,1	12,2	3,9	- 21,0	- 3,56	18		x	
8	119,4	13,9	4,4	126,7	16,1	5,1	- 7,3	- 1,09	18			
24	120,7	21,7	6,9	132,7	17,1	5,4	- 12,0	- 1,38	18			
48	132,0	16,4	5,2	134,6	16,8	5,6	- 2,6	- 0,33	17			
72	136,3	28,1	9,9	130,4	24,4	8,1	5,9	0,47	15			

Tab. A.2.19 Blutglucose-Wert der Mäus nach 192/188-Behandlung mit 30 mg/kg KG i. p.

X = Mittelwert; Δ = Differenzbetrag von behandelten Tieren zu Kontrolltieren;

t = t-Wert für Student-Test; df = Freiheitsgrad für Student-Test

D) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Acher R.
Angew. Chemie 86, 6, 209 (1974)
2. Allison A.C.
Adv. Chemother. 13, 243 (1966)
3. Amos H., Vollmayer E.
J. Bacteriol. 73, 178 (1957)
4. Anné J., de Clerq E., Eyssen H., Dann O.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 2, 231 (1980)
5. Arnold C.G., Gercke H.
Dtsch. Apotheker Ztg. 121, 24 1259 (1981)
6. Arunlakshana O., Schild H.O.
Brit. J. Pharmacol. 14, 48 (1959)
7. Ashley J.N., Barber H.J., Ewins A.J., Newbury G.,
Self A.D.H.
J. Chem. Soc. 103 (1942)
8. Bailey N.M.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 122 (1968)
9. Barber H.J., Slack R., Wien R.
Nature 151, 3821, 107 (1943)
10. Bauer F.
Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskrh.
Hyg. 172, 605 (1958)
11. Becker V.
Klin Wschr. 32, 577 (1954)
12. Berg S.S.
Nature 188, 4756, 1106 (1960)
13. Berg S.S.
J. Chem. Soc. 3635 (1963)

14. Berg S.S., Bretherick L., Washbourn K., Wragg W.R.
J. Chem. Soc. 4623 und
4617 (1963)
15. Bergmann F., Wilson J.B., Nachmansohn D.
Biochem. Biophys. Acta 6, 217 (1950)
16. Bergmeyer U.
Methoden d. enzym. Analyse Band I/II
Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße,
2. Auflage, 1970
17. Bernheim F.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 80, 199 (1944)
18. Bernheim F.
Science 98, 223 (1943)
19. Bichowski L.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57, 163 (1944)
20. Bichowski - Slomnitzki L.
J. Bacteriol. 55, 1, 27 (1948)
21. Bichowski - Slomnitzki L.
J. Bacteriol. 55, 1, 33 (1948)
22. Bichowski - Slomnitzki L.
Arch. Biochem. Biophys. 27, 294 (1950)
23. Bielenberg G.W.
Dissertation Gießen 1983
24. Bierman H.R., Sokolow M.
J. Nat. Cancer Inst. 10, 279 (1949)
25. Bierman H.R., Sokolow M., Randolph E.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 210 (1950)
26. Bierzynski A., Boguta G., Berens K., Wierzychowski K.L.
Stud. Biophys. 67, 57 (1978)
27. Blaschko H., Duthie R.
Biochem. J. 39, 347 (1945)

28. Blaschko H., Fastier F.N., Wajda J.
Biochem. J. 49, 250 (1951)
29. Blaschko H., Himms J.
Brit. J. Pharmacol. 10, 451 (1955)
30. Börger H.H.
EKG - Information
Steinkopff Verlag, Darmstadt
3. Auflage 1980
31. Bornstein R.S., Yarbo J.W.
J. Surgical Oncol. 2, 393 (1970)
32. Bouchard Ph., Sai P., Reach G., Canbarrère D.,
Ganeval D., Assan R.
Diabetes 31, 1, 40 (1982)
33. Brack C., Delain E.
J. Cell Sci. 17, 287 (1975)
34. Brengel E.
Dissertation Erlangen 1982
35. Broom W.A.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 57, 81 (1936)
36. Bruns F., Neuhaus J.
Arch. Biochem. Biophys. 55, 588 (1955)
37. Bryceson A.
East Afr. Med. J. 45, 3, 110 (1968)
38. Busch U.
Dissertation Erlangen 1982
39. Buys C.H.C.M., van der Veen A.Y.
Histochemistry 75, 2, 169 (1982)
40. Caquet, C.R., Froli G., Saimot G., Pastcier A.,
Payet M.
Ann. Méd. int. 126, 10, 665 (1975)
41. Chand N.
Agents & Actions 9, 2, 133 (1979)

42. Chandra P., Mildner B.
Cell. Mol. Biol. 25, 2, 137 (1979)
43. Chappel J.B.
J. Biol. Chem. 238, 1, 410 (1963)
44. Christophers Sir S.R., Fulton J.D.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 32, 43 (1938)
45. McClelland L., van Rooyen C.E.
Canad. J. Res. 27 E, 177 (1949)
46. Cox J.S.G.
Proc. Symp. Roy. Soc. Med. 5.3.1969
47. Cox J.S.G., Beach J.E., Blair A.M.J.N., Clarke A.J.,
King J., Lee T.B., Loveday D.E.E., Moss G.F., Orr T.S.C.,
Ritchie J.T., Shepard P.
Adv. Drug Res. 5, 115 (1970)
48. Dale H.H., Laidlaw P.P.
J. Physiol. 41, 318 (1960)
49. Dann O., Hieke F., Hahn H., Miserre H.-H., Lürding G.,
Rößler R.
Justus Liebig's Ann. Chem. 734, 23 (1970)
50. Dann O.
Plenarvortrag auf d. Tagung der Dtsch. Pharmazeut.
Ges. 28.9.1978, Tübingen
51. Dann O.
Dtsch. Apotheker Ztg. 108, 42, 1595 (1968)
52. Dann O., Bergen G., Demant E., Volz G.
Justus Liebig's Ann. Chem. 749, 68 (1971)
53. Dann O., Char H., Grießmeier H.
Justus Liebig's Ann. Chem. 1836 (1982)
54. Dann O., Fick H., Pietzner B., Walkenhorst E.,
Fernbach R., Zeh D.
Justus Liebig's Ann. Chem. 160 (1975)

55. Dann O., Volz G., Demant E., Pfeiffer W.,
Bergen G., Fick H., Walkenhorst E.
Justus Liebig's Ann. Chem. 1112 (1973)
56. Davson H.
The physiology of the eye
3rd Ed., Edinburgh/London, 1972
57. De Clercq E., Dann O.
J. Med. Chem. 23, 787 (1980)
58. Deutscher Arzneimittel Codex
4. Ergänzungslieferung 1977
Dtsch. Apotheker Verlag, Stuttgart
59. Dtsch. Ges. f. klin. Chemie
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 182 (1972)
60. De Vita V.T., Emmer M., Levine A., Jacobs B.,
Berard C.
New Engl. J. Med. 280, 6, 287 (1969)
61. Dickens F.
Biochem. J. 33, 2017 (1939)
62. Dixon M.
Biochem. J. 55, 170 (1953)
63. Dönges J.
Parasitologie
Thieme Verlag, Stuttgart 1980
64. Drazen J.M., Austen K.F., Lewis R.A., Clark D.A.,
Goto G., Marfat A., Corey E.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 4354 (1980)
65. Duggan A.J.
Trop. Doc. 4, 162 (1973)
66. Duke - Elder S.
The eye in evolution, Vol. I
Verlag H. Kimpton, London 1958

67. Eaton M.D., Perry M.E., Levenson Ch.G., Gocke J.M.
J. Immunol. 68, 321 (1952)
68. Eden A., Correia M.J.
Brain Res. 248, 201 (1982)
69. Ellis H.V., Johnson A.R., Moran N.C.
J. Pharm. Exptl. Ther. 175, 3, 627 (1970)
70. Emmer M., de Vita V.
Ann. int. Med. 69, 3, 637 (1968)
71. Fastier F.N.
Pharmacol. Rev. 14, 37 (1962)
72. Festy B., Daune M.
Biochemistry 12, 4827 (1976)
73. Festy B., Stumm J., Daune M.
Biochim. Biophys. Acta 407, 24 (1975)
74. Findlay G.M.
Recent Advances in Chemotherapy
3. Auflage, Bd. 1
J.&A. Churchill Ltd., London 1950
75. Fleckenstein A.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 51, 15 (1967)
76. Francioli P.B., Keithly J.S., Jones Th.C.,
Brandstetter R.D., Wolf D.J.
Ann. int. Med. 94, 3, 326 (1981)
77. Frank E., Nothmann M., Wagner A.
Klin. Wschr. 5, 45, 2100 (1926)
78. Fuchs E.F.
Laborjournal, Pharmazie, Erlangen 297, 150
79. Fulton J.D., Goodwin T.W.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 84, 34 (1945)
80. Fulton J.D., Mathew K.K.
Brit. J. Pharmacol. 14, 137 (1959)

81. Fulton J.D., Yorke W.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 36, 134 (1942)
82. Furchgott R.F.
in CATECHOLAMINES S. 283
Springer Verlag N.Y. (1972)
83. Furchgott R.F., Bhadrakom S.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 108, 129 (1953)
84. Fussgänger R., Bauer F.
Med. Chem. 6, 504 (1958)
85. Geiger A., Klingler I.J., Comaroff R.
Ann. Trop. Med. 24, 319 (1930)
86. Geratz J.D.
Thromb. Diath. Haemorrh. 23, 486 (1970)
87. Geratz J.D.
Fol. Haematol. 98, 455 (1972)
88. Geratz J.D.
Experientia 25, 12, 1254 (1969)
89. Geratz J.D.
in Pulmonary Emphysema & Proteolysis
Academic Press 325 (1972)
90. Geratz J.D.
Thromb. Diath. Haemorrh. 24, 455 (1972)
91. Geratz J.D., Webster W.P.
Arch. Int. Pharm. Ther. 194, 359 (1971)
92. Gercke H.
Dissertation Erlangen 1979
93. Gerold M., Tschirky H.
Drug Res. 18, 1285 (1968)
94. Gerold M., Fünfschilling H.
Drug Res. 21, 12, 2071 (1971)

95. Gilbert R.J., Newton B.A.
Vet. Rec. 111, 17, 397 (1982)
96. Goodman C.S., Gilman A.
The Pharmacological Basis of Therapeutics
V. Ed., 1038 (1975)
97. Gordon J.J., Sowdon E.
Biochem. J. 44, 498 (1949)
98. Grant A.M., Sandler R.M., Carrell R.M.
Lancet 8036, 510 (1977)
99. Großgebauer K., Kegel M., Dann O.
Dtsch. Med. Wschr. 101, 29, 1098 (1976)
100. Guillory R.J., Slater E.C.
Biochim. Biophys. Acta 105, 221 (1965)
101. Guimares J.L., Lourie E.M.
Brit. J. Pharmacol. 6, 514 (1951)
102. Gyermek L., Bindler E.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 138, 159 (1962)
103. Hajduk S.L.
Science 191, 4228, 858 (1976)
104. Harbaum - Neuhaus G.
Dissertation Erlangen 1980
105. Harbaum - Neuhaus G.
unveröffentlichte Ergebnisse
106. Hatano N., Nakatsuji K., Nose J., Shimizu M.
Pharmacometrics 19, 2, 311 (1980)
107. Hauptmann J., Markwardt F.
Biochem. Pharmacol. 26, 325 (1977)
108. Heischkeil R.
Ztschr. Tropenmed. Parasitol. 22, 243 (1971)
109. Heise E., Kimbel K.H.
Ztschr. Kreislaufforschg. 44, 212 (1955)

110. Henry A.J.
Nature 152, 3867, 690 (1943)
111. Hicks M.
Biochem. J. 72, 22 p (1959)
112. Hieke E.
Pharmazie 18, 10, 653 (1963)
113. Hill G.C., Hutner S.H.
Exp. Parasitol. 22, 207 (1968)
114. Hirschhorn R., Davies Ph., Krakauer K., Weissmann G.
Clin. Res. 17, 2, 354 (1969)
115. Höfkelt T., Terenius L., Kuypers H.G.J.M., Dann O.
Neurosci. Letters 14, 55 (1979)
116. Hollunger G.
Acta Pharmacol. Toxicol. 11, Suppl. 1 (1955)
117. Hundt H.-J., Grünberg H.
Ztschr. Kreislaufforschg. 49, 769 (1960)
118. Jaffe J.J.
Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II, 29, 1057 (1967)
119. Janscő N.v., Janscő H.v.
Ztschr. Immunitätsforschg. 86, 1 (1935)
120. Jennings F.W., Gray G.D., Urquhart G.M.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 2, 204 (1982)
121. Jensch H.
Arzneim. Forschg. 5, 634 (1955)
122. Judah J.D., Williams-Ashman H.G.
Biochem. J. 48, 33 (1951)
123. Jungermann K., Möhler H.
Biochemie
Springer Verlag, Heidelberg 1980
124. Junkersdorf P., Weinand K.
Arch. exptl. Path. Pharmacol. 165, 462 (1932)

125. Kaduk B.
Habilitationsschrift Erlangen 1980
126. Kaliwoda G.
Dissertation Erlangen 1976
127. Kapuściński J., Skoczylas B.
Nucl. Acids Res. 5, 3775 (1978)
128. Kapuściński J., Szer W.
Nucl. Acids Res. 6, 3519 (1979)
129. King H., Lourie E.M., Yorke W.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 32, 177 (1938)
130. Klinkhammer L.V.
Trop. Geogr. Med. 10, 332 (1958)
131. Knick B., Knick J.
Münchn. Med. Wschr. 35, 739 (1983)
132. Kolb R.
Dissertation Erlangen 1983
133. Kopac M.J.
Cancer Res. 7, 714 (1947)
134. Kreutzberger A.
in Fortschr. d. Arzneimittelforsch. (E. Jucker, Ed.)
Vol. 11, 356 (1968)
135. Launoy M.M.L., Guillot M., Jonchère H.
Ann. pharm. fr. 18, 273 (1960)
136. Lehniger A.L.
Biochemie, 2. Auflage, 1977
Verlag Chemie, Weinheim
137. Lepeschkin E.
Das Elektrokardiogramm
Steinkopff Verlag, Dresden-Leipzig, 1942
138. Lin M.S., Alfi O.S.
Chromosoma 57, 219 (1976)

139. Lin M.S., Commings D.E., Alfi O.S.
Chromosoma 60, 15 (1977)
140. Litchfield J.T., Wilcoxon F.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 96, 99 (1949)
141. Lourie E.M., Yorke W.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 31, 435 (1937)
142. Lourie E.M., Yorke W.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 33, 289 (1939)
143. Lütjen - Drecoll E.
in Medikamentöse Glaukomtherapie, Krieglstein G.K.,
Leydhecker W.
J.F. Bergmann Verlag, München 1982
144. Macadam R.F., Williamson J.
Parasitology 57, 21 (1967)
145. Macadam R.F., Williamson J.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 421 (1969)
146. Macadam R.F., Williamson J.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 6, 897 (1972)
147. Macadam R.F., Williamson J.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 68, 3, 291 (1974)
148. Mac Intosh F.C., Paton W.D.M.
J. Physiol. 109, 190 (1949)
149. Makulu D.R., Waalkes Ph.T.
J. Nat. Cancer Inst. 54, 2, 305 (1975)
150. Mann U.
Dissertation Erlangen 1983
151. Manning A.S., Hearse D.J., Dennis S.C., Bullock G.R.,
Coltarz D.J.
Europ. J. Cardiol. 11, 1, 1 (1980)
152. Marshall P.B.
Brit. J. Pharmacol. 3, 8 (1948)

153. Mildner B., Chandra P.
Cell. Molec. Biol. 25, 6, 399 (1979)
154. Minet G.
Dissertation Erlangen 1980
155. Minot A.S.
J. Pharmacol. Exptl. Ther. 43, 295 (1931)
156. Molander D.W., Wroblewski F., La Due J.S.
J. Lab. Clin. Med. 46, 6, 831 (1955)
157. Murphey S.A., Josephs A.S.
Arch. Int. Med. 141, 56 (1981)
158. Nauck E.G.
Tropenkrankheiten
Thieme Verlag, Stuttgart 1975
159. Newton B.A.
Biochem. J. 105, 50 p (1967)
160. Ogada T., Fink E., Mbwabi D.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 2, 280 (1973)
161. Orr T.S.C., Cox J.S.G.
Nature 223, 5202, 197 (1969)
162. Philips F.S., Sternberg S.S., Cronin A.P.,
Sodergren J.E., Vidal P.M.
Cancer Res. 27, 1, 333 (1967)
163. Pille G.
Méd. Trop. 13, 859 (1953)
164. Pine M.J., Di Paolo J.A.
Cancer Res. 26, 18 (1966)
165. Pointdexter H.A.
J. Parasitol. 21, 4, 292 (1935)
166. Pressman B.
J. Biol. Chem. 238, 1, 401 (1963)
167. Penney D.G., Sodt P.C., Cutilletta A.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 50, 213 (1979)

168. Pharmacological Experiments
on intact Preparations
E.&S. Livingstone, Edinburgh-London 1970
169. Pharmacological Experiments
on isolated Preparations
E.&S. Sivingstone, Edinburgh-London 1970
170. Raether W., Seidenath H.
Zeitschr. Tropenmed. Parasitol. 22, 1, 66 (1971)
171. Raether W., Hajdú P., Seidenath H., Damm D.
Zeitschr. Tropenmed. Parasitol. 25, 42 (1974)
172. Raether W., Hajdú P., Seidenath H., Damm D.
Zeitschr. Tropenmed. Parasitol. 23, 418 (1972)
173. Raether W., Seidenath H.
Tropenmed. Parasitol. 27, 238 (1976)
174. Ramm B., Hofmann G., Hahn N.
Biomathematik und medizinische Statistik
Enke Verlag, Stuttgart 1976
175. Reid J.C., Weaver J.C.
Cancer Res. 11, 188 (1951)
176. Reiner L., Smythe C.V., Pedlow J.T.
J. Biol. Chem. 113, 75 (1936)
177. Riley J.F.
The Mast Cells
E.&S. Livingstone, Edinburgh-London 1959
178. Robbins J.B., Miller R.H., Areal V.M., Pearson H.A.
New Engl. J. Med. 272, 14, 708 (1965)
179. Rocchi A., Di Castro M., Prantera G.
Cytogen. Cell Gen. 27, 70 (1980)
180. Ruebush T.K., Rubin R.H., Wolpow E.R., Cassaday P.B.,
Schultz M.G.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 28 (2), 184 (1979)

181. Ruff J.
Dissertation Erlangen 1979
182. Ruffolo R.R., Waddell J.E.
Brit. J. Pharmacol. 77, 169 (1982)
183. Rummelt A.
Dissertation Erlangen 1983
184. Russel W.C., Newman C., Williamson D.H.
Nature 253, 461 (1975)
185. Sachs L.
Angewandte Statistik
Springer Verlag, Heidelberg 1978
186. Samuelsson B.
Int. Arch. All. Appl. Immun 66, Suppl. 1, 98 (1981)
187. Sati M.H.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 43, 4 (1949)
188. Saunders G.F.T.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 35, 169 (1941)
189. Scott M.
J. Am. Med. Ass. 203, 10, 893 (1968)
190. Sevag M.G., Gots J.S.
J. Bacteriol. 56, 723 (1948)
191. Sibley J.A.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 339 (1958)
192. Siegenthaler W.
Klinische Pathophysiologie, 3. Auflage
Thieme Verlag, Stuttgart 1976
193. Snapper J.
J. Am. Med. Ass. 133, 3, 157 (1947)
194. So C.S.
Praktische Elektrokardiographie
Selecta Verlag, Planegg 1974

195. Soltys M.A.
Zeitschr. Tropenmed. Parasitol. 22, 2, 120 (1971)
196. Szelenyi I., Thiemer K.
Arzneim. Forschg. 27, 4, 809 (1977)
197. Schäfer G.
Biochem. Pharm. 25, 2005 (1976)
198. Schäfer G.
Biochem. Pharm. 25, 2015 (1976)
199. Schern K., Artagaveytia-Allende R.
Zeitschr. Immunitätsforschg. 89, 6, 484 (1936)
200. Schiantarelli P., Bongrani S., Folco G.
Europ. J. Pharmacol. 73, 363 (1981)
201. Schmidt H., Pathol. Inst. Univ. Erlangen-Nürnberg
persönliche Mitteilung
202. Schmidt H., Fink E., Dann O.
Ztbl. allg. Pathol. pathol. Anat. 121, 554 (1977)
203. Schmidt H., Kaduk B., Fink E.
Vortrag auf der Veterinärpathologentagung
12.4.1977, Erlangen
204. Schnedl W., Dann O., Schweizer D.
Europ. J. Cell Biol. 20, 290 (1980)
205. Schnedl W., Mikelsaar A.-V., Breitenbach M., Dann O.
Hum. Gen. 36, 167 (1977)
206. Schnedl W., Roscher U., van der Ploeg M., Dann O.
Cytobiologie 15, 357 (1977)
207. Schneider W.C.
J. Biol. Chem. 176, 259 (1948)
208. Schrems W.
Med. Mo. Pharm. 6, 6, 162 (1983)
209. Schürger G.
unveröffentlichte Ergebnisse

210. Schürger G.
persönliche Mitteilung
211. Schürger G.
Dissertation Erlangen 1982
212. Schulz J.C., Westfall D.P.
Blood Vessels 19, 79 (1982)
213. Schuhmacher F.A.W.
Dissertation Erlangen 1979
214. Schweizer D.
Exp. Cell Res. 102, 408 (1976)
215. Schweizer D.
Chromosoma 58, 307 (1976)
216. Starke K., Docherty J.R.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 3, Suppl. 1, S 14 (1981)
217. Steck E., Kinnamon K.E., Rane D.S., Hanson W.L.
Exptl. Parasitol. 52, 3, 404 (1981)
218. Steiger R.F., Layton D.G., Pirson Ph., Gillet J.,
Herman F.
J. Parasitol. 66, 2, 352 (1980)
219. Steiner D.F., Williams R.H.
Biochim. Biophys. Acta 30, 329 (1958)
220. Stepień E., Filutowicz M., Fikus M.
Acta Biochim. Pol. 26, 29 (1979)
221. Stepień E., Dann O., Fikus M., Wierzchowski K.L.
Stud. Biophys. 67, 135 (1978)
222. Tallarida R.J., Murray R.B.
Manual of pharmacological calculations
Springer Verlag, N.Y. 1981
223. Tidwell R.R., Geratz J.D., Dubovi E.J.
J. Med. Chem. 26, 294 (1983)
224. Tidwell R.R., Geratz J.D., Dann O., Volz G., Zeh D.,
Loewe H.
J. Med. Chem. 21, 613 (1978)

225. Uvnäs B.
Biochem. Pharmacol. 12, 439 (1963)
226. van Rossum J.M.
Arch. Int. Pharmacodyn. 143, 3, 299 (1963)
227. Vogler H., Röttcher D.
Symposium über trypanocide fluoreszierende Diamidine
19. - 20.2.1982, Erlangen
228. Voigt G.
Acta Histochem. 4, 122 (1927)
229. Volz G.
Laborjournal 192, 188
230. Waalkes T.Ph., Denham Ch., de Vita V.T.
Clin. Pharmacol. Ther. 11, 4, 505 (1970)
231. Waldman R.H., Pearce D.E., Martin R.A.
Am. Rev. Resp. Dis. 108, 1004 (1973)
232. Wallis O.C.
J. Protozool. 13, 234 (1966)
233. Walsmann P., Horn H., Landmann H., Markwardt F.,
Stürzebecher J., Wagner G.
Pharmazie 30, 6, 386 (1975)
234. Wang J.J., Freeman A.I., Gaeta J.F., Sinks L.F.
J. Paediatr. 77, 2, 311 (1970)
235. Watkins T.I., Woolfe G.
Nature 169, 4299 (1952)
236. Weissmann G., Davies Ph., Krakauer K., Hirschhorn R.
Biochem. Pharmacol. 19, 2, 1251 (1970)
237. Werner W., Rey H.-G., Wielinger H.
Zeitschr. analyt. Chem. 252, 224 (1970)
238. Wien R.
Brit. J. Pharmacol. 3, 211 (1948)
239. Wien R.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 37, 1 (1943)

240. Wien R., Freeman W., Scotcher N.M.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 37, 19 (1943)
241. Williamson D.H., Fennell D.J.
in Methods in Cell Biology (D.Prescott, Ed.)
p. 335-351, Academic Press, N.Y. 1975
242. Williamson J.
Pharmac. Ther. 7, 3, 445 (1979)
243. Williamson J.
Trop. Dis. Bull. 73, 7, 531 (1976)
244. Williamson J.
Brit. J. Pharmacol. 14, 443 (1959)
245. Wroblewski F., La Due J.I.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 91, 4, 571 (1956)
246. Yecies L.D., Parker C.W.
Monogr. Allergy 14, 155 (1979)
247. Yecies L.D., Wedner H.J., Johnson S.M., Parker C.W.
Fed. Proc. Am. Soc. Exptl. Biol. 37, 1667 (1978)
248. Yorke W., Adams A.R.D., Murgatroyd F.
Ann. Trop. Med. 23, 501 (1929)
249. Zeller E.A.
Helv. Chim. Acta 21, 1645 (1938)

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. C.-J. Estler, unter dessen Leitung diese Arbeit in der Zeit von Januar bis Oktober 1980 und Januar 1982 bis Dezember 1983 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt wurde.

Seine fördernde Unterstützung und das mir entgegengebrachte, stets wohlwollende Verständnis und Vertrauen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. O. Dann möchte ich Dank sagen für die Anregungen zu dieser Arbeit, für die Überlassung der verwendeten Substanzen und die Mühe bei der Durchsicht der Niederschrift.

Herrn Prof. Dr. K. Brand danke ich für die Überlassung der Apparaturen und die Unterstützung bei den Versuchen zur Mitochondrienatmung.

Für die abschließende Beurteilung der EKG-Ergebnisse danke ich Herrn Dr. med. G. Habich, Institut für Anästhesiologie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Herrn Dr. med. P. Hohenberger, Pathologisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die Auswertung der Gewebsschnitte.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau S. Schütze und Herrn J. Binöder für ihre technische Assistenz, sowie allen Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

- 27.03.1950 Geboren in Nürnberg als erstes Kind des kfm. Angestellten Otto Steinmann und seiner Ehefrau Käthe, geb. Ebert
- 1956 - 1958 Besuch der Volksschule Heroldsberg
- 1958 - 1962 Besuch der Volksschule Nürnberg, Scharrerstr.
- 1962 - 1963 Besuch der Oberrealschule Gunzenhausen
- 1963 - 1965 Besuch der Martin-Behaim-Oberrealschule, Nürnberg
- 1965 - 1967 Besuch des Alexander-von-Humboldt-Gymnasiums, Schweinfurt
- Sept. 1967 Rückkehr ans Martin-Behaim-Gymnasium, Nürnberg
- 19.06.1971 Abitur am Martin-Behaim-Gymnasium, Nürnberg
- 01.07.1971 Beginn eines Apothekenpraktikums in der Martin-Apotheke, Bamberg
- 22.03.1973 pharmazeutische Vorprüfung in Bayreuth
- 11.03.1974 Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg
- 17.03.1977 erster Prüfungsabschnitt, bestanden
- 19.05.1979 Eheschließung mit der pharmazeutisch-technischen Assistentin Gabriele Kurzawski aus Zell b. Schweinfurt
- 14.11.1979 zweiter Prüfungsabschnitt, bestanden
- 01.01.1980 Doktorand und Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten bei Herrn Prof. Dr. C.-J. Estler am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg
- 02.01.1980 Approbation als Apotheker
- 01.10.1980 Einberufung zum Wehrdienst
- 31.12.1981 Beendigung des Wehrdienstes
- 01.01.1982 Wiederaufnahme der Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen